

Analyse der Transmembran-Agrin- abhängigen Signalkaskade in auswachsenden Axonen des zentralen Nervensystems

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

René Ramseger

geboren am 25.01.1978

in Neuwied

Mainz, 2007

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Die Funktion von Agrin an der neuromuskulären Endplatte	- 1 -
1.2	Agrin Struktur	- 3 -
1.3	Agrin im zentralen Nervensystem	- 6 -
1.3.1	Expression von Agrin im zentralen Nervensystem	- 6 -
1.3.2	Funktion von Agrin während der Synaptogenese im zentralen Nervensystem	- 6 -
1.3.3	Agrin vermittelte Genexpression im zentralen Nervensystem	- 8 -
1.3.4	Nicht-synaptogene Funktion von Agrin im zentralen Nervensystem	- 8 -
1.4	TM-Agrin reguliert die Bildung von Filopodien in neuronalen Zellen	- 10 -
2	ZIELSETZUNG	- 14 -
3	MATERIAL	- 15 -
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	- 15 -
3.2	Biochemikalien und Enzyme	- 16 -
3.3	Fertigbausätze für molekular-, zellbiologische und biochemische Untersuchungen	- 18 -
3.4	Antikörper	- 18 -
3.5	Plasmide	- 19 -
3.6	Zelllinien	- 20 -
3.7	Tiere	- 20 -
4	METHODEN	- 21 -
4.1	Molekularbiologische Methoden	- 21 -
4.1.1	(Re-) Transformation von DNA	- 21 -
4.1.2	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E.coli</i>	- 21 -
4.1.3	Absorptionsmessung von DNA	- 22 -
4.1.4	Analytischer Restriktionsverdau von DNA	- 22 -
4.1.5	Gelelektrophorese von DNA	- 22 -
4.2	Zellbiologische Methoden	- 23 -
4.2.1	Beschichtung von Deckgläsern und Petrischalen	- 23 -
4.2.2	Auftauen und Kryokonservierung von Zellen	- 24 -
4.2.3	Kultivierung von HEK 293 und CHO Zellen	- 24 -
4.2.4	Zellzahlbestimmung	- 24 -
4.2.5	Transfektion und Nukleofektion von Zellen	- 25 -

4.2.6	Quantitative Auswertung der Ausläuferbildung	- 26 -
4.2.7	Kultivierung von Muskelzellen	- 26 -
4.2.8	Präparation von Basallaminae	- 27 -
4.2.9	Explantate retinaler Ganglienzellen	- 27 -
4.2.10	Induktion von Ausläufern	- 28 -
4.2.11	Präparation von tektalen Neuronen	- 28 -
4.2.12	Verwendung von Inhibitoren und Aktivatoren	- 28 -
4.2.13	Immunocytochemie	- 29 -
4.3	Biochemische Methoden	- 30 -
4.3.1	Zelllyse	- 30 -
4.3.2	Trichloressigsäure Fällung	- 30 -
4.3.3	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese	- 31 -
4.3.4	Coomassiefärbung	- 31 -
4.3.5	Silberfärbung	- 31 -
4.3.6	Western-Blot Analyse	- 32 -
4.3.7	Ponceau S Färbung	- 32 -
4.3.8	Koimmunopräzipitation	- 32 -
4.3.9	Isolierung von Triton-X100-unlöslichen Glycosphingolipid-reichen Membranfraktionen	- 33 -
4.3.10	Affinitätsreinigung von Immunoglobulinen (IgG)	- 34 -
4.3.11	Statistische Auswertung	- 34 -
5	ERGEBNISSE	- 35 -
5.1	TM-Agrin induziert die Bildung von Ausläufern in nicht-neuronalen Zellen	- 35 -
5.2	TM-Agrin und lipid rafts	- 37 -
5.2.1	TM-Agrin ist in biochemisch isolierten lipid rafts aus nicht-neuronalen und neuronalen Zellen lokalisiert	- 37 -
5.2.2	TM-Agrin ist in lipid rafts neuronaler Zellen lokalisiert	- 41 -
5.2.3	Lipid rafts sind notwendig für die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer	- 42 -
5.3	Die Aktivierung von TM-Agrin induziert die Phosphorylierung an Tyrosinresten bestimmter Proteine	- 45 -
5.4	Fyn ist notwendig für die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern	- 47 -
5.4.1	TM-Agrin induziert die Phosphorylierung von Fyn in neuronalen Zellen	- 47 -
5.4.2	Fyn wird TM-Agrin abhängig in nicht-neuronalen Zellen phosphoryliert	- 49 -
5.4.3	Immunocytochemische Analyse der Phosphorylierung von Fyn in TM-Agrin überexprimierenden nicht-neuronalen Zellen	- 51 -
5.4.4	Die TM-Agrin abhängige Phosphorylierung von Fyn ist notwendig für die Ausläuferbildung	- 53 -
5.5	Die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern ist abhängig von der Mitogen aktivierten Protein Kinase	- 54 -
5.5.1	TM-Agrin induziert die Phosphorylierung der Mitogen aktivierten Protein Kinase	- 55 -
5.5.2	Für die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer ist eine aktive Mitogen aktivierte Protein Kinase erforderlich	- 56 -

5.6	Fyn wird stromaufwärts von der Mitogen aktivierten Protein Kinase aktiviert	- 57 -
5.7	Zyklisches Guanosinmonophosphat aber nicht zyklisches Adenosinmonophosphat und die Phosphatidylinositol-3 Kinase sind notwendig für die Bildung von Ausläufern	- 59 -
5.8	Die Bildung von Ausläufern ist Kalzium abhängig	- 62 -
5.9	Der Coxsackie-Adenovirus Rezeptor interagiert mit TM-Agrin und beeinflusst die Bildung von Ausläufern	- 63 -
5.9.1	CAR bindet an TM-Agrin	- 63 -
5.9.2	Der Coxsackie-Adenovirus Rezeptor kolokalisiert mit TM-Agrin	- 65 -
5.9.3	Coxsackie-Adenovirus Rezeptor überexprimierende Zellen bilden Ausläufer	- 65 -
5.9.4	Die Maskierung von CAR verhindert die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer	- 68 -
6	DISKUSSION	- 71 -
6.1	Die Bildung TM-Agrin-induzierter Ausläufer: Ein Spezies- und Zelltyp-spezifischer Mechanismus?	- 71 -
6.2	Lipid rafts dienen als Signalplattform für die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern	- 73 -
6.3	Wie induziert TM-Agrin die Phosphorylierung signalweiterleitender Proteine?	- 75 -
6.4	Kalzium und zyklisches Guanosinmonophosphat beeinflussen die TM-Agrin vermittelte Ausläuferbildung	- 79 -
6.5	Das Transmembranprotein CAR interagiert mit TM-Agrin und reguliert die Bildung von Ausläufern	- 82 -
6.6	Vergleich Agrin induzierter Signalkaskaden: Neuromuskuläre Endplatte versus Fortsatzbildung	- 86 -
6.7	Modell der TM-Agrin induzierten Signalkaskade	- 87 -
6.8	Funktion Filopodien-ähnlicher Ausläufer <i>in vivo</i>	- 89 -
7	ZUSAMMENFASSUNG	- 92 -
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 93 -
9	LITERATURVERZEICHNIS	- 96 -

1 EINLEITUNG

1.1 Die Funktion von Agrin an der neuromuskulären Endplatte

Agrin ist ein Heparansulfat Proteoglykan mit einem Molekulargewicht von etwa 600 kDa und einer weit verbreiteten Expression in vielen Geweben, wie z.B. der Skelettmuskulatur, den Nierenglomeruli und den Blutgefäßen (Godfrey et al., 1988; Godfrey, 1991; Halfter, 1993; Kröger und Mann, 1996; Magill Solc und McMahan, 1988). Die Funktion von Agrin, ungeachtet seiner ausgedehnten Expression, ist bis dato fast ausschließlich an der neuromuskulären Endplatte (NMJ) untersucht. Die NMJ ist eine spezielle Synapse des peripheren Nervensystems (PNS) und stellt die Kommunikationsstelle zwischen der Axonendigung eines Motoneurons und einer Muskelfaser dar. Die Prä- und Postsynapse an der NMJ sind biochemisch und morphologisch hoch spezialisiert. Diese Spezialisierungen sind essentiell für die synaptische Transmission, weshalb die Bildung dieser Spezialisierungen zu den Schlüsselprozessen der Synaptogenese an der NMJ gehört. Ausführliche *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen der NMJ veranlassten McMahan 1990 dazu die Agrin Hypothese zu formulieren. Diese Hypothese besagt, dass Agrin im Soma von Motoneuronen im ventralen Horn des Rückenmarks synthetisiert wird, anterograd zur Axonendigung des Motoneurons, respektive der Präsynapse, transportiert wird, in den synaptischen Spalt der NMJ freigesetzt wird, wo es stabil mit der Basalmembran assoziiert. Basalmembran-gebundenes Agrin ist dann verantwortlich für die Bildung, Aufrechterhaltung und Regeneration der NMJ (McMahan, 1990).

An der NMJ induziert Agrin außer der Aggregation einer Reihe von Molekülen auf der Skelettmuskelfaser, wie z.B. die des Azetylcholinrezeptors (AChR) und der Azetylcholinesterase, zudem die Bildung synaptischer Falten im synaptischen Bereich der Muskelfasern (Ruegg und Bixby, 1998). Weiterhin resultiert die Zugabe von Agrin zu isolierten Muskeln in der Dekondensation von Chromatin in subsynaptischen Muskelfaserzellkernen (Ravel-Chapuis et al., 2007). Darauf folgt in den subsynaptischen Zellkernen die Expression von spezifischen und nur dort transkribierten Genen, welche z.B. für die ϵ -Untereinheit des AChR oder Utrophin kodieren. (Gramolini und Jasmin, 1998; Jones et al., 1996; Lacazette et al., 2003; Rimer et al., 1997). Ferner induziert Agrin die Bildung von Ausläufern auf Muskelfasern (Uhm et al., 2001), und präsynaptische Spezialisierungen an der sich entwickelnden NMJ (Gautam et al., 1996). Agrin ist also der Hauptregulator der Synaptogenese an der neuromuskulären Endplatte.

Die Differenzierung der Prä- und Postsynapse wird durch Bindung von Agrin an einen heteromeren Rezeptorkomplex an der Postsynapse induziert (Glass et al., 1996), dessen signaltransduzierender Teil die Tyrosinkinase MuSK ist (Muskel Spezifische-Kinase, (Valenzuela et al., 1995)). Die Agrin induzierte Aktivierung von MuSK führt unter anderem zur Phosphorylierung von Tyrosinresten des AChR (Gesemann et al., 1995). Agrin bindet nicht direkt an MuSK, sondern an einen bis dato nicht identifizierten „Agrin-bindenden Teil“ des heteromeren Rezeptorkomplexes (Glass et al., 1996; Herbst und Burden, 2000). MuSK ist jedoch unbedingt notwendig für die durch Agrin vermittelten Signalkaskaden, denn MuSK-defiziente Mäuse sterben (DeChiara et al., 1996), ebenso wie Agrin-defiziente Mäuse (Gautam et al., 1996) während der Geburt aufgrund nicht ausgebildeter postsynaptischer Spezialisierungen und der damit verbundenen Inaktivität unter anderem der Atemmuskulatur. Zudem sind sich entwickelnde Muskelfasern MuSK-defizienter Mäuse in Gegenwart von Agrin nicht mehr im Stande AChR zu aggregieren. Stromabwärts von MuSK konnten bis dato mehrere Moleküle identifiziert werden, welche die Aggregation des AChR beeinflussen (Strochlic et al., 2005).

Rapsyn, ein 43 kDa großes AChR assoziiertes Protein bindet an den zytoplasmatischen Teil von MuSK (Antolik et al., 2006) und vermittelt die Verankerung des AChR über das Aktin Vernetzung Familie 7 Protein (ACF7) im Aktin Zytoskelett (Antolik et al., 2007) und somit die Aggregation des AChR (Moransard et al., 2003). Ferner konnte gezeigt werden, dass die GTPasen der Rho-Familie Cdc42, RhoA und Rac1 Agrin-abhängig aktiviert werden. Die Aktivierung der GTPasen ist notwendig für die Aggregation des AChR, da die Expression von dominant-negativen GTPase Konstrukten in kultivierten Muskelfasern die Agrin induzierte Aggregation des AChR blockieren. Im Gegensatz dazu induzieren konstitutiv-aktive GTPasen selbst in Abwesenheit von Agrin die Aggregation des AChR (Weston et al., 2003; Weston et al., 1999; Weston et al., 2007). Ausserdem bilden kultivierte Muskelfasern in Abwesenheit von Agrin, nach Zugabe des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) Analogons 8-bromo-cGMP, AChR Aggregate aus (Jones und Werle, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass stromabwärts der Kinase (DOK)-7 (Okada et al., 2006), die Casein Kinase-2 (Cheusova et al., 2006) und die Geranylgeranyltransferase-1 (Luo et al., 2003), MuSK- und Agrin-abhängig, die Bildung von AChR Aggregaten induzieren. Die Phosphorylierung des AChR, die Aggregation des AChR und die Aufrechterhaltung bereits gebildeter AChR Aggregate sind ausserdem von intrazellulären Kalziumströmen abhängig, wohingegen extrazelluläres Kalzium die Phosphorylierung von MuSK beeinflusst (Borges et al., 2002; Megeath und Fallon, 1998). Die Induktion der synapsenspezifischen Genexpression

verläuft allerdings über andere Signalwege als die Aggregation des AChR (Escher et al., 2005; Trinidad et al., 2000).

Die grundlegende Bedeutung von Agrin während der Bildung der NMJ konnte mehr als zehn Jahre nach seiner Entdeckung durch zwei entscheidende Experimente bestätigt werden. Zum einen zeigen Mäuse mit einem inaktivierten Agrin Gen dramatische morphologische Veränderungen sowohl der Prä- als auch der Postsynapse der NMJ. Die einwachsenden Motoneurone verzweigen sich, wachsen über die Muskelfasern hinaus und bilden keine Präsynapse. Daraus resultierend bilden sich zudem keine postsynaptischen Spezialisierungen und die wenigen, unabhängig von Agrin, spontan gebildeten AChR Aggregate sind nicht an der Kontaktstelle von Muskelfaser und Motoneuron lokalisiert. Folglich ist die Signalweiterleitung zwischen Prä- und Postsynapse erheblich eingeschränkt, weshalb homozygote Mäuse bereits während der Geburt aufgrund völliger Immobilität und nicht funktionierender Atemmuskulatur sterben (Gautam et al., 1996; Li et al., 1999). Zum anderen resultiert die ektopische Expression von Agrin im extrasynaptischen Bereich innervierter und auch denervierter Muskelfasern in der Bildung von ektopischen, postsynaptischen Spezialisierungen *in vivo*. Weiterhin wird hierdurch die Transkription synapsenspezifischer Gene induziert (Jones et al., 1996; Jones et al., 1997; Rimer et al., 1997). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen somit, dass Agrin nicht nur notwendig sondern auch hinreichend für die Entwicklung der NMJ ist.

1.2 Agrin Struktur

Die Agrin cDNA konnte aus mehreren Spezies, wie z.B. dem Zitterrochen *Discopyge ommata* (Smith et al., 1987), dem Frosch *Xenopus laevis* (Cohen und Godfrey, 1992), dem Zebrafisch (Kim et al., 2007b), dem Huhn (Tsim et al., 1992), der Ratte (Rupp et al., 1991) und dem Menschen (Groffen et al., 1998) isoliert werden. Das Agrin Gen kodiert für ein Protein mit mehr als 2.000 Aminosäuren (AS) und einem berechneten Molekulargewicht von ca. 225 kDa. Aufgrund der starken Glykosylierung des Proteins ergibt sich jedoch ein tatsächliches Molekulargewicht von ca. 600 kDa (Gesemann et al., 1995; Kröger und Mann, 1996; Tsen et al., 1995). In der N-terminalen Hälfte des Proteins befinden sich drei Serin/Glycin Konsensussequenzen, die als Verknüpfungsstellen für Glykosaminoglykan- (GAG) Seitenketten, wie z.B. Heparansulfat und Chondroitinsulfat, dienen (Winzen et al., 2003). Zusätzlich findet man mehrere Konsensussequenzen für N-verknüpfte Glykosylierungsstellen. Die durch die Agrin cDNA kodierten verschiedenen strukturellen Domänen des Agrin Proteins sind in Abbildung eins dargestellt. In der C-terminalen Region

von Agrin befinden sich drei Domänen (LG1, LG2 und LG3) mit Ähnlichkeiten zu der globulären Domäne der Laminin- α -Kette und der Neurexine (Timpl et al., 2000), sowie vier EGF-ähnliche Domänen (E). Weiterhin sind zwei Serin/Threonin-reiche Regionen (S/T) im zentralen Bereich des Proteins lokalisiert, die ein sogenanntes SEA-Modul (Segurken Spermaprotein, Enterokinase und Agrin; (Bork und Patthy, 1995) flankieren. Im N-terminalen Bereich des Proteins befinden sich neun Follistatin-ähnliche Domänen (FS). Zusätzlich finden sich im Polypeptidrückgrat von Agrin zwei Laminin/EGF-ähnliche Domänen (LE), welche die Follistatin-ähnliche Domäne acht und neun trennen. Bis dato sind mehrere Bindestellen für Liganden identifiziert worden. An die GAG-Seitenketten der S/T Domäne und der siebten FS Domäne können sowohl der Fibroblasten Wachstumsfaktor-2 (FGF-2; (Cotman et al., 1999b) als auch Thrombospondin (Cotman et al., 1999b), das neurale Zelladhäsions Molekül

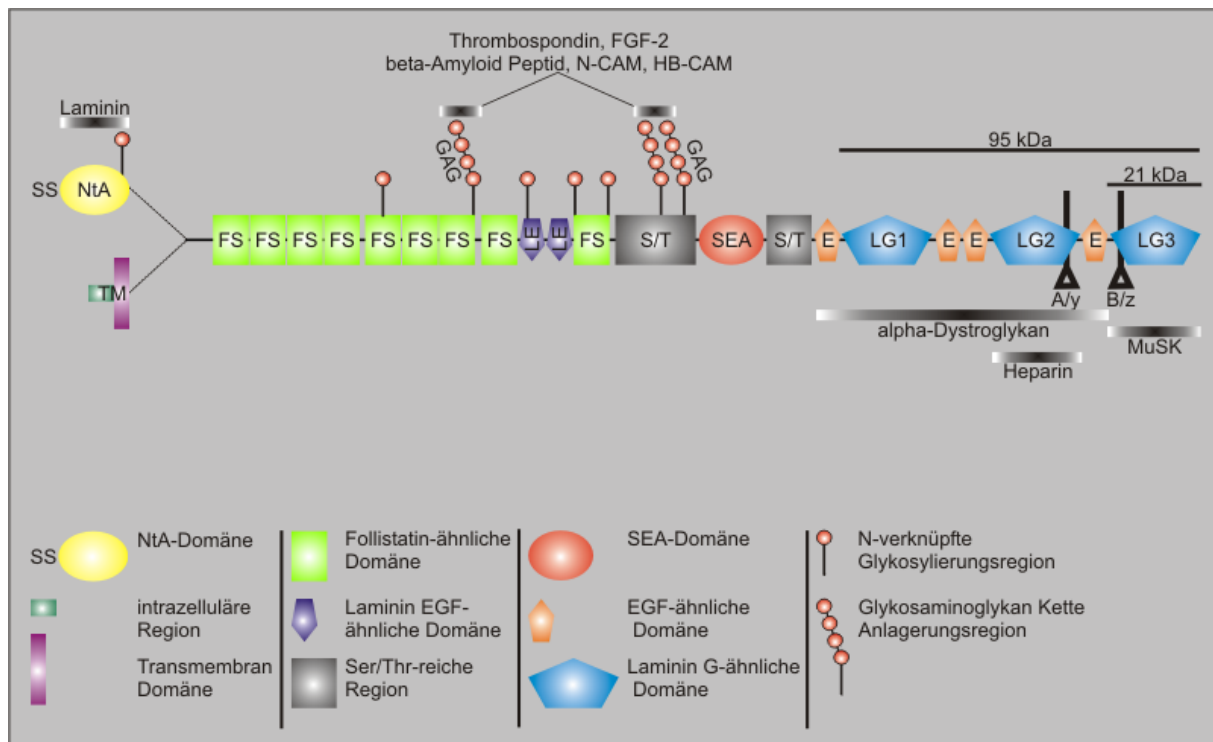


Abb.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Agrin Proteins. Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher erster Exone entstehen zwei N-terminale Isoformen: NtA-Agrin und TM-Agrin. TM-Agrin enthält eine Transmembrandomäne und eine kurze intrazellulär lokalisierte Region. NtA-Agrin hingegen besteht aus einer Signalsequenz zur Sekretion des Proteins in den extrasynaptischen Spalt und einer Laminin bindenden NtA-Domäne. Der gesamte Rest des Proteins, der bei TM-Agrin extrazellulär lokalisiert ist, ist bei beiden Isoformen vollkommen identisch. Im N-terminalen Bereich befinden sich neun Follistatin-ähnliche (FS) und zwei Laminin EGF-ähnliche (LE) Domänen. Im zentralen Bereich sind zwei Serin/Threonin (S/T)-reiche Regionen durch ein SEA- (Seegurken Spermaprotein, Enterokinase und Agrin) Modul getrennt. In der C-terminalen Region befinden sich drei globuläre Domänen (LG) und vier EGF-ähnliche (E) Domänen. Die schattierten Boxen stellen Bindestellen für die angegebenen Proteine dar. Durch alternatives Spleißen an zwei Positionen (A/y, B/z) im C-terminalen Bereich des Proteins entstehen Isoformen, die sich in ihrem Expressionsmuster und ihrer synaptogenen Aktivität unterscheiden.

(N-CAM; (Storms et al., 1996), das Heparin-bindende Zelladhäsions Molekül (HB-CAM; (Daggett et al., 1996) und das beta-Amyloid Peptid (Cotman et al., 1999a) binden. Die LG2

Domäne fungiert als Bindungsstelle für Heparin (Gesemann et al., 1996). Die LG1 und LG2 Domänen bilden zusammen mit den benachbarten EGF-ähnlichen Domänen eine Bindungsstelle für die Kohlenhydratseitenketten des extrazellulären Matrixproteins α -Dystroglykan. MuSK bindet an ein 21 kDa großes C-terminal gelegenes Fragment (Burgess et al., 2002). Tenascin bindet an den Proteinkern von Agrin, die genaue Bindungsregion ist bisher jedoch nicht identifiziert (Cotman et al., 1999b). In der C-terminal gelegenen Region von Agrin, respektive in der globulären Domäne 2 und 3 (LG2, LG3), befinden sich zwei Spleißstellen A/y und B/z (A und B im Huhn, y und z in Säugetieren). Alternatives Spleißen der Agrin prä-mRNA in der A/y Region (0 oder 4 Aminosäureinsert) und der B/z Region (0, 8, 11 oder 19 Aminosäureinsert; (Ferns et al., 1993; Ruegg et al., 1992) resultiert in der Expression von Agrin Proteinen die unterschiedlich stark in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Zudem unterscheiden sie sich in ihrer biologischen Aktivität. Nur Agrin Isoformen mit einem Insert in Position A/y und B/z sind in der Lage, die Bildung der neuromuskulären Endplatte zu induzieren. Andere Isoformen (A/y0 und B/z0) sind dazu nicht in der Lage – ihre physiologische Funktion ist noch weitgehend unbekannt. Ein 95 kDa großes Fragment von Agrin im C-terminalen Bereich des Proteins, dass sich aus den drei LG Domänen (LG1 – LG 3) und den dazwischen liegenden EGF-ähnlichen Domänen zusammensetzt, ist ausreichend um alle postsynaptischen Spezialisierungen an der NMJ *in vitro* (Cornish et al., 1999; Gesemann et al., 1995; Hoch et al., 1994) und *in vivo* (Godfrey et al., 2000) zu induzieren.

Durch die Verwendung verschiedener Transkriptionsstartpunkte, vermutlich unter der Regulation unterschiedlicher Promotoren, werden zwei Agrin Isoformen gebildet die sich in Bezug auf ihre Struktur, ausschliesslich im äußersten N-Terminus, unterscheiden (siehe Abb.1). Lediglich die lösliche, sekretierte Isoform (NtA-Agrin) kann über die nur in Agrin beschriebene NtA Domäne an die γ -1 Kette von Laminin und somit an die Basalmembran binden (Denzer et al., 1995; Denzer et al., 1998; Mascarenhas et al., 2003). Demnach ist NtA-Agrin die N-terminale Isoform, die vermutlich für die Bildung, Aufrechterhaltung und Regeneration der NMJ verantwortlich ist. Bei der zweiten N-terminalen Isoform (TM-Agrin) handelt es sich um ein Transmembranprotein. Anstatt der NtA Domäne befindet sich im N-Terminus von TM-Agrin eine 34 AS lange, intrazellulär lokalisierte Region und eine 23 AS lange α -helikale Transmembrandomäne (Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001). Die 23 Aminosäure kurze, α -helikale Transmembrandomäne ist innerhalb der bisher untersuchten Spezies (Huhn, Maus, Ratte, Mensch) stark konserviert und sorgt durch einen nicht spaltbaren Signalanker für den Einbau von TM-Agrin in die Zellmembran. Die 34 Aminosäure lange,

intrazelluläre Region, weist keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen auf. Der gesamte Rest des Proteins ist extrazellulär lokalisiert. Aufgrund dieser Orientierung zählt TM-Agrin deshalb zu den Typ-II-Transmembranproteinen (N_{cyto} und C_{exo}). Sowohl NtA-Agrin als auch TM-Agrin sind hochglykosyliert und mit Glykosaminoglykan Seitenketten verknüpft.

TM-Agrin wird im Gegensatz zu NtA-Agrin hauptsächlich im ZNS, vor allen Dingen in Neuronen (Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001), aber auch in Gliazellen (Tournell et al., 2006), exprimiert. Die Synthese wird entwicklungsabhängig reguliert und erfolgt hauptsächlich während der Phase des axonalen Wachstums.

1.3 Agrin im zentralen Nervensystem

1.3.1 Expression von Agrin im zentralen Nervensystem

Da in der vorliegenden Arbeit die transmembrane Isoform des Heparansulfat Proteoglykans Agrin, die wie oben erwähnt hauptsächlich im ZNS exprimiert wird, untersucht wird, möchte ich in den folgenden Abschnitten die Rolle von Agrin im sich entwickelnden ZNS einführen. Agrin wird während der Entwicklung des ZNS sowohl von nicht-neuronalen als auch von neuronalen Zellen synthetisiert, wobei einzelne Neurone mehrere Agrin Isoformen gleichzeitig exprimieren können (Annies und Kröger, 2002). Die Expression von Agrin im ZNS beginnt sehr früh und wird entwicklungsabhängig reguliert, seine Funktion hingegen ist bis dato jedoch weitgehend unbekannt (Cohen et al., 1997; Li et al., 1997). Aufgrund der weitreichenden Expression von Agrin werden verschiedene, mögliche Funktionen von Agrin unterschieden, welche in den nächsten Abschnitten erläutert werden.

1.3.2 Funktion von Agrin während der Synaptogenese im zentralen Nervensystem

Die Anreicherung von Agrin im synaptischen Spalt von interneuronalen, cholinergen (Gingras und Ferns, 2001), GABAergen und glycinergen Synapsen (Koulen et al., 1996; Kröger und Mann, 1996; Ksiazek et al., 2007) lassen die Annahme zu, dass Agrin, analog zu seiner Funktion an der NMJ, auch im ZNS die Bildung von Synapsen beeinflussen kann. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass Agrin in Synaptosomenpräparationen aus Gesamthirn angereichert ist (Böse et al., 2000; Koulen et al., 1999), dass Agrin von ZNS Neuronen sekretiert wird (Kröger und Mann, 1996) und dass aus dem ZNS isoliertes Agrin die Aggregation des AChR induzieren kann. In Übereinstimmung mit einer möglichen Rolle von Agrin bei der Synaptogenese im ZNS, resultiert eine akute Blockierung von Agrin in Hippocampuskulturen von Wildtyp-Mäusen durch „antisense Oligonukleotide“ oder

funktionsinhibierende Antikörper zu einer reduzierten Aggregation der Glutamat und γ -Aminobuttersäurerezeptoren (GABA) und somit einer Störung der Synapsenbildung und der synaptischen Transmission (Böse et al., 2000; Ferreira, 1999). Konsistent mit einer verminderten Aggregation von GABA-Rezeptoren wird die Expression von Gephyrin, welches in die Aggregation der Glycin- und GABA-Rezeptoren involviert ist (Kirsch et al., 1993), durch Inkubation mit Agrin „antisense Oligonukleotiden“ inhibiert (Ferreira, 1999). Weiterhin ist die Aggregation des Synapsen-assoziierten Proteins synGAP und die Zirkulation synaptischer Vesikel gestört. Im Gegensatz zu der gestörten Synapsenbildung hippocampaler und kortikaler Wildtyp Neurone, bei denen Agrin akut durch Zugabe von „antisense Oligonukleotiden“ oder funktionsinhibierenden Antikörpern blockiert wurde, sind bei Hippocampus- und Kortexkulturen Agrin-defizienter Mäuse Glutamat- und GABA-Rezeptoren normal verteilt. Auch die synaptische Transmission ist identisch in parallel kultivierten Neuronen von Wildtyp und Agrin-defizienten Mäusen (Ferreira, 1999; Li et al., 1999; Serpinskaya et al., 1999). Eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse könnte die Existenz von funktionell redundanten Molekülen und damit die Aktivierung kompensatorischer Mechanismen während der frühen Phase der Entwicklung Agrin-defizienter Mäuse sein. Bei einer direkten, akuten Blockierung der Agrinfunktion können kompensatorische Mechanismen jedoch keinen Einfluss ausüben. In Übereinstimmung mit einer möglichen Rolle von Agrin bei der Synaptogenese im ZNS resultiert die ektopische Zugabe von gereinigtem Agrin zu Hippocampuskulturen in einer vermehrten Bildung, der für synaptische Vesikel charakteristischen Proteine, Synaptophysin und Synapsin I (Mantych und Ferreira, 2001). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass mehr neuronale Synapsen gebildet werden, wenn hippocampale Neurone auf einem Substrat von Astrozyten, in denen die Expression von Agrin durch Zugabe von Progesteron stimuliert wurde, kultiviert werden (Tournell et al., 2006). Zusätzliche Indizien dafür das Agrin die Synaptogenese im ZNS beeinflussen könnte liefern Resultate aus dem Labor von Martin A. Smith. Smith und Kollegen konnten zeigen, dass Agrin *in vitro* und *in vivo* an die α -3-Untereinheit der Natrium Kalium ATPase (NKA) bindet. Ausserdem konnte anhand von Färbungen kortikaler Neurone mit anti-Agrin, anti-NKA Antikörpern und einem Antikörper gerichtet gegen den Synapsenmarker Synaptophysin gezeigt werden, dass Agrin und die NKA in synaptischen Bereichen angereichert sind und kolokalisieren (Hilgenberg et al., 2006). Diese Entdeckung hat zu der Hypothese geführt, dass die NKA einen neuronalen Rezeptor von Agrin, der wichtig für die Synaptogenese ist, darstellen könnte. Die genaue Rolle von Agrin im ZNS, nicht nur während der Synaptogenese, ist derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

1.3.3 Agrin vermittelte Genexpression im zentralen Nervensystem

Neben einer möglichen Rolle von Agrin während der Synaptogenese sprechen einige Untersuchungsergebnisse für weitere Funktionen von Agrin im sich entwickelnden ZNS. Agrin induziert die Phosphorylierung und dadurch Aktivierung des „cAMP response-element binding“ (CREB) Proteins in kultivierten Hippocampus Neuronen (Ji et al., 1998). Darüber hinaus führt die ektopische Zugabe von Agrin zu Kulturen von postnatalem Kortex, Hippocampus und Cerebellum zu einer verstärkten Expression des „immediate-early“ Gens *c-fos* (Hilgenberg et al., 1999). Für die Synthese von *c-fos* ist die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK), die Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase 2 (CAMK) sowie Kalzium verantwortlich. Weitere signalweiterleitende Moleküle, welche die Expression von *c-fos* beeinflussen, konnten bisher nicht identifiziert werden (Hilgenberg und Smith, 2004; Hilgenberg et al., 1999). Im Gegensatz zu *c-fos* ist die Aktivierung von CREB Agrin Isoform spezifisch (Hilgenberg et al., 1999; Ji et al., 1998). Aufgrund der oben dargestellten Untersuchungsergebnisse stellt sich die Frage, ob Agrin über zwei unterschiedliche oder den gleichen Rezeptor, jedoch durch Bindung verschiedener Agrin Isoformen, seine Wirkung auf CREB und *c-fos* entfaltet. Obwohl die physiologische Relevanz der Aktivierung bzw. Expression der beiden Transkriptionsfaktoren CREB und *c-fos* unklar ist, deutet vieles darauf hin, dass Agrin in ZNS Neuronen ebenso wie an der NMJ einen Einfluss auf die Genexpression haben könnte. Bis dato sind die intrazellulären Signalkaskaden, die zur Aktivierung von CREB bzw. zur Expression von *c-fos* führen jedoch weitgehend unbekannt (Kröger und Schröder, 2002).

1.3.4 Nicht-synaptogene Funktion von Agrin im zentralen Nervensystem

Bereits vor dem Beginn der Synaptogenese können hohe Konzentrationen von Agrin in den ventrikulären und subventrikulären Zonen des sich entwickelnden ZNS detektiert werden, was darauf schliessen lässt, dass Agrin weitere nicht-synaptische Funktionen im ZNS übernimmt. Die ventrikulären Zonen setzen sich aus säulenförmigen Neuroepithelzellen, aus denen Glia und Neurone entstehen können, zusammen. Aufgrund der Verteilung von Agrin kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass Agrin die Neuro- und/oder Gliogenese beeinflusst. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese nimmt die Expression von Agrin in den ventrikulären Zonen im Laufe der Entwicklung ab und ist im adulten Gehirn in diesen Bereichen nicht mehr vorhanden (Cohen et al., 1997; Stone und Nikolics, 1995). Ausserdem bindet Agrin an den Fibroblasten Wachstumsfaktor-2 (FGF-2, (Cotman et al., 1999b), welcher die Neurogenese beeinflusst indem er die Selbsterneuerung von Stammzellen nach

asymmetrischer Zellteilung und die Entstehung von Neuronen oder Glia aus Stammzellen moduliert (Ghosh und Greenberg, 1995; Ray und Gage, 1994).

Neben einer möglichen Rolle von Agrin während der Neuro- und Gliogenese sprechen einige Untersuchungsergebnisse für weitere nicht-synaptische Funktionen von Agrin im ZNS. Im adulten ZNS wird z.B. die Agrin Isoform, welche kein AS Insert an der B/Z Spleißstelle enthält (B/Z0), überwiegend in den Basalmembranen von Blutgefäßen und der weichen Hirnhaut (*Pia mater encephali*) exprimiert (Barber und Lieth, 1997). Die Bedeutung der Assoziation von Agrin mit den Basallaminae von Blutgefäßen ist nicht schlüssig. Allerdings korreliert das Maximum der Agrin Expression in den Basallaminae von Blutgefäßen mit der Bildung der Blut-Hirnschranke. Daher könnte Agrin notwendig für die Bildung der Blut-Hirnschranke sein. Zudem wird Agrin in Basallaminae von Blutgefäßen außerhalb des ZNS, wie z.B. dem Thymus, den Testis und den Nierenglomeruli, synthetisiert. Diese Strukturen besitzen ähnliche „Barrierefunktionen“ wie die Blut-Hirnschranke und unterstützen somit die Vermutung, dass Agrin bei der Bildung solcher „Barrierestrukturen“ beteiligt sein könnte.

Aufgrund der weitreichenden Expression von Agrin im ZNS wird zudem angenommen, dass Agrin neben der Neuro- und/oder Gliogenese und der Bildung der Blut-Hirnschranke auch das gerichtete axonale Wachstums beeinflussen könnte. Unter Anderem wird Agrin auf Gliazellen, die wichtig für die Wegfindung der Axone während der Ontogenese des ZNS sind, exprimiert (Halfter et al., 1997; Powell et al., 1997). Auf Gliazellen exprimiertes Agrin könnte daher als Substrat für das Axonwachstum dienen. *In vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass die axonale Wegfindung abhängig von $\beta 1$ -Integrin ist, welches wiederum mit Agrin interagiert (Bixby et al., 2002; Martin und Sanes, 1997). Weitere Moleküle wie z.B. N-CAM, Laminin, Thrombospondin und Merosin, die ebenfalls Einfluss auf die axonale Wegfindung haben, interagieren ebenfalls mit Agrin (Bixby et al., 2002; Cotman et al., 1999b). Agrin wird jedoch nicht nur von Gliazellen sondern auch direkt auf Axonen und deren Wachstumskegeln, besonders während der Phase des aktiven axonalen Wachstums exprimiert (Neuhuber und Daniels, 2003). Die Expression von Agrin wird runter reguliert sobald die Axone ihr Zielgebiet erreicht haben (Halfter et al., 1997). Demzufolge ist es möglich, dass Agrin die axonale Wegfindung, aufgrund der zeitlichen Korrelation zwischen axonalem Wachstum und Agrin Expression auf Neuronen, moduliert. Übereinstimmend mit dieser Hypothese resultiert die ektopische Zugabe von Agrin zu kultivierten Neuronen, isoliert aus den Hippocampi von Ratten, in der Bildung von kurzen, stark verzweigten Axonen sowie langen, ebenfalls stark verzweigten Dendriten im Vergleich zu Kontrollkulturen, die nicht mit Agrin behandelt wurden (Mantych und Ferreira, 2001).

Konsistent damit führt die akute Blockierung der Agrin Expression in Hippocampuskulturen zur Bildung längerer, jedoch weniger verzweigter Axone und langen, aber wenig verzweigten Dendriten (Mantych und Ferreira, 2001). Die Inkubation kultivierter, spinaler Neurone aus *Xenopus laevis* mit rekombinatem Agrin führt ebenso wie bei Ratten Hippocampus Kulturen zur Bildung von verkürzten Axonen. Ob die mit Agrin behandelten spinalen Neurone analog zu den hippocampalen Ratten Neuronen ebenfalls mehr axonale Verzweigungen ausbilden, wurde jedoch nicht untersucht (Xu et al., 2005)

Weitere Hinweise für eine Rolle von Agrin während des axonalen Wachstums lieferten die erst kürzlich veröffentlichten Daten von Kim et al. die zeigen, dass eine Blockierung der Agrin Expression in Zebrafisch Embryonen zu einem gestörten Wachstum von primären Motoneuronen, von Branchiomotoneuronen und von sensorischen Rohon-Beard Neuronen im PNS führt (Kim et al., 2007a). Die in diesem Abschnitt geschilderten Beobachtungen lassen somit auf eine Funktion von Agrin während des axonalen Wachstums nicht nur im ZNS sondern auch im PNS schliessen.

1.4 TM-Agrin reguliert die Bildung von Filopodien in neuronalen Zellen

In den oben dargestellten Untersuchungen wurde nie zwischen den beiden N-terminalen Isoformen von Agrin unterschieden. Innerhalb des ZNS wird jedoch hauptsächlich die transmembrane Isoform und nicht die sekretierte Isoform (NtA-Agrin) von Agrin synthetisiert. Konsistent damit wird auch auf auswachsenden Axonen und Dendriten ausschließlich die transmembrane Isoform von Agrin (TM-Agrin) exprimiert (Annies und Kröger, 2002; Neumann et al., 2001).

Die Entdeckung einer membranständigen Isoform von Agrin, mit lediglich einer α -helikalen Transmembrandomäne, ließ die Hypothese zu, dass TM-Agrin als Rezeptor mit signaltransduzierenden Eigenschaften fungieren könnte. Um diese Vermutung zu überprüfen machte man es sich zu nutze, dass fast alle Rezeptoren mit einer einzelnen Transmembrandomäne auch ohne Kenntnis des physiologischen Liganden durch Kreuzvernetzung mit polyklonalen Antikörpern multimerisiert und dadurch aktiviert werden können (Heldin, 1995; Weiss und Schlessinger, 1998).

Um zu untersuchen ob TM-Agrin solch ein Rezeptor sein könnte, wurden RGC Axone mit polyklonalen anti-Agrin Antikörpern inkubiert. Dies resultierte in dramatischen morphologischen Veränderungen der Axone (Annies et al., 2006). Entlang des gesamten Axons bildeten sich zahlreiche Filopodien-ähnliche Ausläufer (Abb.2, C; D und F). Die durch polyklonale anti-Agrin Antikörper induzierten Ausläufer können jedoch nicht durch

Präimmunseren (Abb.2, A; B und E), monoklonale Antikörper und Fab-Fragmente von polyklonalen Antikörpern induziert werden, da diese aufgrund ihrer Struktur nicht dazu befähigt sind mehrere TM-Agrin Proteine in der Zellmembran zu verbinden (Annies et al., 2006). Daher können die Ausläufer ausschliesslich durch Inkubation mit polyklonalen Antikörpern erzeugt werden. Die Ausläuferbildung kann ausserdem durch Präinkubation der anti-Agrin Antikörper mit gereinigtem Agrin verhindert werden, da dadurch die Agrin Bindestellen der Antikörper blockiert werden (Annies et al., 2006). Die Bildung der Ausläufer ist deshalb von der vorangehenden Multimerisierung einzelner, endogener TM-Agrin Proteine in der Membran abhängig, was mit der Hypothese, dass TM-Agrin als Rezeptor fungiert, konsistent ist. Darüber hinaus konnte durch Verwendung von TM-Agrin siRNA Konstrukten gezeigt werden, dass TM-Agrin der entscheidende Faktor für die Bildung Filopodien-ähnlicher Ausläufer ist. Mit TM-Agrin siRNA Konstrukten transfizierte hippocampale Neurone bilden zum Einen weniger neue Ausläufer aus, und zum Anderen kommt es aufgrund der Unterdrückung der TM-Agrin Expression zu einer Destabilisierung bereits gebildeter Ausläufer (McCroskery et al., 2006).

Die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern ist allerdings nicht nur auf retinale Ganglienzellen (RGC) und hippocampale Neurone beschränkt. Sowohl auf Axonen anderer Neuronentypen des ZNS, als auch des PNS, sowie auf Dendriten können Ausläufer durch Zugabe polyklonaler Antikörper induziert werden. Die Anzahl an Ausläufern pro Axon- bzw. Dendritsegment ist jedoch im Durchschnitt bei ZNS Neuronen höher als bei PNS Neuronen, am höchsten jedoch bei den untersuchten Dendriten (Annies et al., 2006). Die Ausläufer enthalten, wie anti-Agrin Färbungen zeigen, TM-Agrin in punktierter Anordnung, was ebenfalls auf eine Multimerisierung durch die Antikörper hindeutet (Abb.2, D; Pfeilköpfe). Phalloidin Färbungen (Abb.2, F) zeigen, dass die Ausläufer F-Aktin enthalten. Dies weist darauf hin, dass eine Reorganisation des axonalen Aktin Zytoskeletts für die Bildung der Ausläufer nötig ist. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass die Desintegration des Aktinfilamentsystems durch Inkubation mit Cytochalasin D, die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer vollkommen inhibiert (Annies et al., 2006). Desweiteren findet sich in den meisten Ausläufern Fascin (McCroskery et al., 2006), ein Protein, welches die Quervernetzung von Aktin induziert, GAP-43 und Synaptotagmin (Annies et al., 2006).

Die Analyse von Zeitraffer-videomikroskopischen Aufnahmen ergab, dass die Bildung der Ausläufer ein hoch dynamischer Prozess ist, der bereits wenige Minuten nach Zugabe der anti-Agrin Ak beginnt. Nach circa dreistündiger Inkubation mit anti-Agrin Antikörpern wird die maximale Anzahl an Ausläufern erreicht (Annies et al., 2006). Die TM-Agrin induzierten

Ausläufer wachsen hierbei lateral aus den Axon- und Dendritenschäften heraus, adhären an das Substrat und üben Zugkräfte auf das Axon bzw. den Dendriten aus. Ausserdem bilden die Ausläufer an ihren Spitzen Wachstumskegel aus, die jedoch nicht stabilisiert werden und deshalb wieder kollabieren.

Die Untersuchung der für die Ausläuferbildung notwendigen Region innerhalb von TM-Agrin ergab, dass eine Disulfidbrücke zwischen dem Cysteinen an Position 535 und 567 in der extrazellulär lokalisierten siebten Follistatin-ähnlichen Domäne (vgl. Abb.1), sowie die Verankerung dieser Domäne in einem gewissen Abstand zur Zellmembran, essentiell ist (Porten et. al., Manuskript in Vorbereitung).

Die Bildung Filopodien-ähnlicher Ausläufer kann nicht nur durch Aggregation von endogenem TM-Agrin durch Inkubation mit polyklonalen anti-Agrin Antikörpern induziert werden, sondern auch durch Überexpression von TM-Agrin in kultivierten hippocampalen Neuronen (McCroskery et al., 2006). Aufgrund der Überexpression von TM-Agrin kommt es zu einer sehr starken Anreicherung des Proteins in der Zellmembran und dadurch möglicherweise zu einer Selbstaggregation einzelner TM-Agrin Proteine in der Membran, was die Aktivierung einer Signalkaskade mit nachfolgender Bildung der Fortsätze erklären könnte.

Die molekularen Mechanismen die zur Bildung von TM-Agrin induzierten Ausläufern führen, sind bisher allerdings kaum untersucht. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Cdc42, einem Mitglied der Familie der Rho-GTPasen, TM-Agrin abhängig hoch reguliert wird. Die Inkubation kultivierter RGC mit Staurosporin und Pervanadat hingegen, welche die Funktion von NtA-Agrin an der NMJ inhibieren können, haben keine Auswirkung auf die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer (Annie et al., 2006; McCroskery et al., 2006). Daraus kann man schließen, dass unterschiedliche Signalkaskaden an der Bildung der NMJ und der Ausläufer auf Axonen beteiligt sind. Die physiologische Funktion von TM-Agrin und der Mechanismus der zur Bildung TM-Agrin induzierter Filopodien-ähnlicher Ausläufer auf den RGC, sowie den anderen untersuchten Neuronentypen, führt, ist bis dato nicht geklärt.

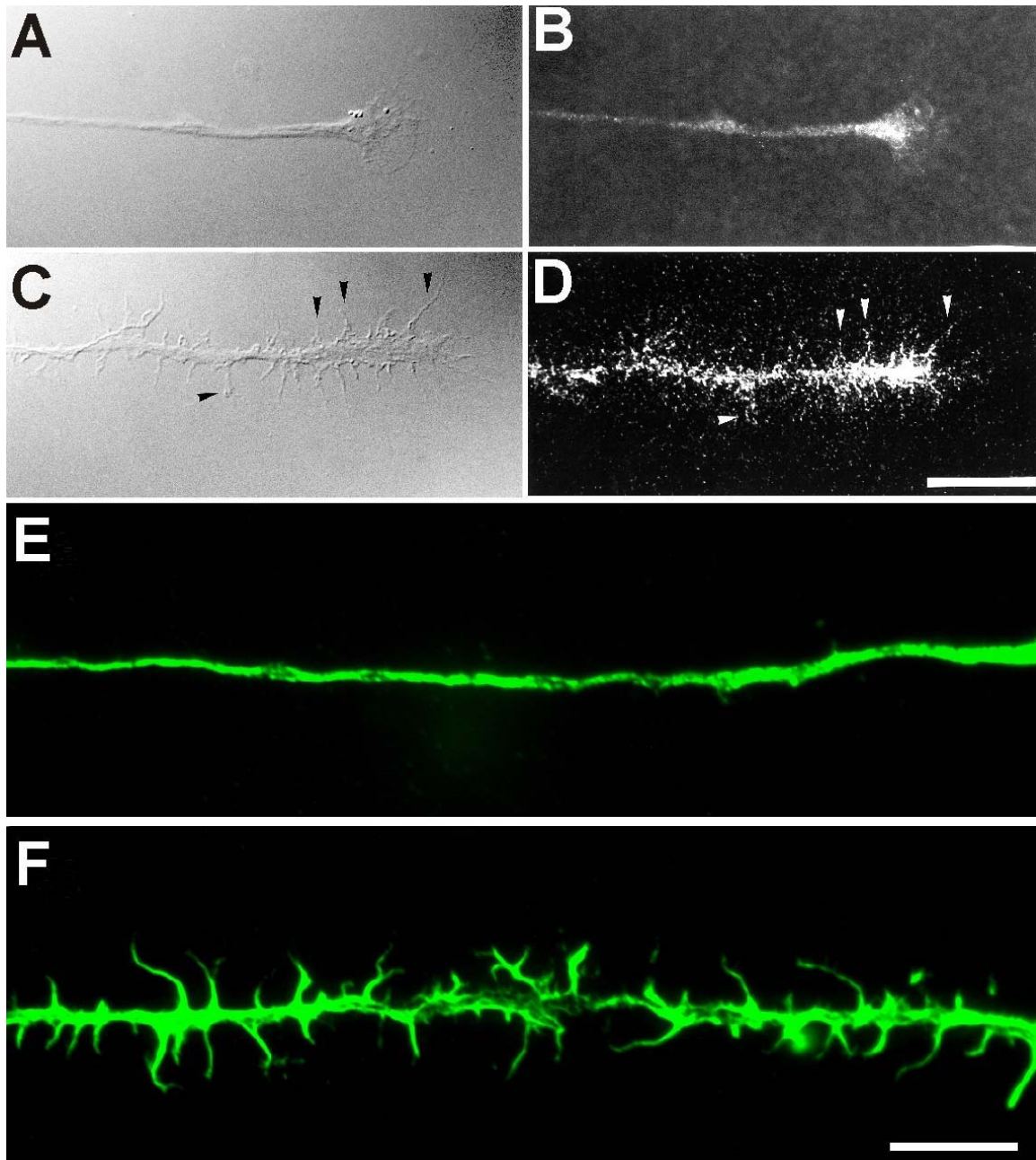


Abb.2: TM-Agrin induziert die Bildung von Ausläufern auf kultivierten Axonen. Die kultivierten Axone wurden entweder 3 Std. mit Präimmunserum (A, B, E) oder mit anti-Agrin Ak inkubiert (C, D, F) und danach fixiert. Die Axone mit Wachstumskegel sind in Nomarski Optik (A, C) und nach Färbung mit anti-Agrin Ak dargestellt (B, D). Auf den mit anti-Agrin Ak inkubierten Axonen bilden sich zahlreiche Fortsätze aus (Pfeilköpfe; C, D). Die Ausläufer zeigen eine starke, punktierte TM-Agrin Färbung (Pfeilköpfe; D). TM-Agrin findet sich ebenfalls auf Axonen die mit Präimmunserum behandelt wurden, zeigt dort jedoch ein gleichmäßiges Verteilungsmuster über das gesamte Axon. Phalloidin Färbungen von Axon Segmenten, kultiviert in der Gegenwart von Präimmunserum (E) und anti-Agrin Ak zeigen, dass die durch TM-Agrin induzierten Ausläufer Aktin enthalten, was auf eine Reorganisation des axonalen Zytoskeletts hindeutet (Skalierungsbalken = 10 μm ; Abbildung aus Annies et al.; 2006)

2 ZIELSETZUNG

Die transmembrane Isoform (TM-Agrin) des Heparansulfat Proteoglykans Agrin besteht aus einer kurzen, intrazellulär lokalisierten Region, einer α -helikalen Transmembran-Domäne und einer großen, stark glykosylierten extrazellulären Region. TM-Agrin wird auf verschiedenen Axonen und Dendriten des zentralen (ZNS) und peripheren (PNS) Nervensystems exprimiert. Nach Aktivierung, durch Inkubation mit polyklonalen Antikörpern oder durch Überexpression, induziert TM-Agrin die Bildung Filopodien-ähnlicher Ausläufer auf Axonen und Dendriten des ZNS und PNS. Diese Ausläufer enthalten unterschiedliche zytoskeletale Elemente wie z.B. Aktin und sind hoch dynamisch. Die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer erfordert die Verankerung des Proteins in der Zellmembran, sowie eine intakte siebte Follistatin-ähnliche Domäne. Über welche Signalkaskade(n) TM-Agrin die Bildung von Filopodien-ähnlichen Ausläufern vermittelt ist bisher nicht bekannt.

Ziel der Dissertation war es deshalb die intrazelluläre(n) Signalkaskade(n), die durch TM-Agrin in Axonen induziert werden, zu charakterisieren, und die zeitliche Abfolge der intrazellulären Ereignisse zu analysieren. Speziell sollen folgende Fragen untersucht werden:

- 1) Beschränkt sich die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer auf bestimmte Zelltypen und Spezies oder handelt es sich um einen ubiquitären Bildungsmechanismus?
- 2) Welche löslichen, membranassoziierten oder in der Membran verankerten Moleküle interagieren von der extrazellulären Seite her mit TM-Agrin und „aktivieren“ es?
- 3) Welche signalweiterleitenden Moleküle vermitteln intrazellulär die durch TM-Agrin induzierte Bildung von Filopodien-ähnlichen Ausläufern?

Diese Fragestellungen sollten anhand folgender methodischer Ansätze untersucht werden:

- Überexpression von TM-Agrin in unterschiedlichen Spezies und Zelltypen.
- Untersuchung Detergenzien-unlöslicher Fraktionen.
- Analyse TM-Agrin vermittelter Aktivierung signalweiterleitender, intrazellulär lokalisierter Moleküle.
- Inhibierung möglicher TM-Agrin induzierter Signalwege.

3 MATERIAL

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab.1: Geräte und Material

GERÄT/MATERIAL	HERSTELLER
Bio-Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Tank-Blot PerfectBlue Tank-Elektroblotter WebS	PeqLab (Erlangen)
Centrikon-Röhrchen	Amikon (Denver, MA, USA)
CO ₂ -Inkubator	WTB Binder (Tuttlingen)
Deckgläser	Assistent (Sodenheim)
Dialyse Kassetten (Slide A Lyzer)	Pierce (Bonn)
Digitalkamera (DC250)	Leica (Solms)
Elektrophoresekammern - für Agarosegele - SDS-Gele	Werkstatt Physiologische Chemie und Pathobiochemie (Mainz) Sigma (Deisenhofen)
Filterpapier	Machery-Nagel (Düren)
Folienschweissgerät	Severin (Sundern)
Gasbrenner (Fireboy)	Integra Biosciences (Fernwald)
Heizblock (Thermomixer 5436)	Eppendorf (Hamburg)
Inkubator (Molekularbiologie)	WTB Binder (Tuttlingen)
Küvetten	Eppendorf (Hamburg)
Magnetheizrührer	IKA Labortechnik (Staufen)
Mikroskope - Stereomikroskop Leica MZ7 ₅ - Fluoreszenzmikroskop Leica DMRA - Zellkultur Invertmikroskop Zeiss 473012-9901	Leica (Solms) Leica (Solms) Zeiss (Oberkochen)
Nukleofektor I	Amixa (Köln)
Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel-Gläser (Mainz)
Peristaltikpumpe	Gilson (Bad Camberg)
Präparationsbank (Laminar Air Flow)	Gelaire (Sydney, Australien)
pH-Meter	Schott (Mainz)
Pipetten (Pipetman)	Gilson (Bad Camberg)
Polyvinylidenfluorid Membran (PVDF)	Millipore (Schwalbach)
Präzisionspinzetten	Dumont-Fils (Schweiz)
Röntgenfilme Hyperfilm TM ECL TM	Amersham Biosciences (Freiburg)
Schüttler	Gerhardt Laboratory Instruments (Bonn)
Spannungsquelle Powerpack 35/75	Phase (Berlin)
Sterilbank (Hera Safe)	Heraeus (Hanau)

GERÄT/MATERIAL		HERSTELLER
Taumelschüttler		Heidolph (Schwabach)
Tank-Blot PerfectBlue Tank-Elektroblotter WebS		PeqLab (Erlangen)
Ultraschallbad (Sonorex)		Bandelin (Mörfelden-Walldorf)
Überkopfschüttler		Heidolph (Schwabach)
Vortexer VF2		IKA Labortechnik (Staufen)
Wasserbad U3		Julabo Labortechnik (Seelbach)
Whatman 3 MM Papier		Whatman International Ltd. (Maidstone, UK)
Zählkammer, Neubauer		Assistent (Sodenheim)
Zellkulturautoklav 2540 EL		Tuttnauer (Wesel)
Zentrifugen	- Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
	- Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf (Hamburg)
	- Ultrazentrifuge RC5B Plus	Sorvall (Langenselbold)
	- Ultrazentrifuge Optima Max	Beckmann-Coulter (Krefeld)
	- Zellkultur-Zentrifuge 302 K	Sigma (Deisenhofen)

Steriles Verbrauchsmaterial, wie Plastikpipetten, Zellkulturschalen, -platten und -flaschen, sowie Plastikgefäße zur Aufbewahrung von Lösungen wurden von den Firmen Falcon (Heidelberg), Greiner (Frickenhäusen) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Glasgefäße der Firma Schott (Mainz) wurden vor Gebrauch autoklaviert.

3.2 Biochemikalien und Enzyme

Tab.2: Biochemikalien und Enzyme für Zellkultur, Molekularbiologie und Biochemie

NAME	HERSTELLER
Acrylamid	Roth (Heidelberg)
Agarose NEE0	Roth (Heidelberg)
Ampicillin	Roth (Heidelberg)
APS	Sigma (Deisenhofen)
BAPTA-AM	Sigma (Deisenhofen)
β-Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen)
10x PBS („phosphate buffered saline“)	GibcoBRL (Karlsruhe)
Complete EDTA free Protease Inhibitoren Cocktail	Roche (Mannheim)
Coomassie (Roti®-Blue)	Roth (Heidelberg)
Dako® Fluorescent Mounting Medium	DAKO (Glostrup, DK)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenyl-indol) Farbstoff 33258	Hoechst (Frankfurt)
db-cAMP	Sigma (Deisenhofen)

NAME	HERSTELLER
db-cGMP	Sigma (Deisenhofen)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Sigma (Deisenhofen)
Extraktionspuffer (PhosphoSafe™ Extraction Buffer)	EMD Chemicals, Inc. (San Diego, CA, USA)
Cholera Toxin beta Subunit FITC	Sigma (Deisenhofen)
Citifluor® Fluorescent Mounting Medium	Plano (Wetzlar)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
FCS Gold	PAA (Linz)
FCS-177	PAA (Linz)
Fibronektin	Sigma (Deisenhofen)
HBSS (Hank's Balanced Salt) Medium	Sigma (Deisenhofen)
Kanamycin	Roth (Heidelberg)
Laminin (von Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma)	Sigma (Deisenhofen)
MEM (minimum essential media)	Sigma (Deisenhofen)
Methyl-β-Cyclodextrin	Sigma (Deisenhofen)
Neurobasal A Medium	Invitrogen (Gaithersburg, MD, USA)
Opti Prep Density Gradient Medium	Sigma (Deisenhofen)
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus	MBI Fermentas (St-Leon)
Page Ruler™ Unstained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas (St-Leon)
PD 98059	Biomol GmbH (Hamburg)
PDMP	Sigma (Deisenhofen)
Penicillin/Streptomycin	PAA (Linz)
Peptone	Merck (Darmstadt)
Phallotoxin (Alexa Fluor 488 Phalloidin)	Molecular Probes (Göttingen)
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma (Deisenhofen)
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma (Deisenhofen)
Poly-A-Sepharose Beads	Amersham Biosciences (Freiburg)
Poly-L-Lysin	Sigma (Deisenhofen)
PP1	Biomol GmbH (Hamburg)
Pyruvat	GibcoBRL (Karlsruhe)
Rp-cAMPS Triethylammonium Salz	Sigma (Deisenhofen)
Rp-8-[(4-Chlorophenyl)thio]-cGMPS Triethylammonium Salz	Sigma (Deisenhofen)
RPMI 1640 Medium	Invitrogen (Gaithersburg, MD, USA)
Select Agar	GibcoBRL (Karlsruhe)
Select Hefe Extrakt	GibcoBRL (Karlsruhe)
Super-Fect®	Qiagen (Hilden)

NAME	HERSTELLER
TEMED	Sigma (Deisenhofen)
Tetrazyklin	Merck (Darmstadt)
Triton-X-100	Sigma (Deisenhofen)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen)
Wortmannin	Sigma (Deisenhofen)

Nicht explizit aufgeführte Biochemikalien, Lösungsmittel oder Salze in p.a. Qualität wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Böhringer (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon), Merck (Darmstadt), PeqLab (Erlangen), Pharmacia (Freiburg), Roche (Mannheim), Roth (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

3.3 Fertigbausätze für molekular-, zellbiologische und biochemische Untersuchungen

Tab.3: verwendete Fertigbausätze

NAME	HERSTELLER
Chicken Nucleofector® Kit	Amara (Köln)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce (Bonn)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep® 8 Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)

3.4 Antikörper

Tab. 4: Primärantikörper für Immunfluoreszenz- und Western-Blot Analysen

<u>ANTI-KÖRPER</u>	<u>SPEZIES</u>	<u>VERDÜNNUNG</u>	<u>REFERENZ</u>
anti-Actin (MAB 1501)	Maus	1:5.000	Chemicon (Schwalbach)
anti-Agrin (#46 IgG)	Kaninchen	1:500 – 1:10.000	Tsen et al., 1995 Kröger et al., 1996
anti-CAR (25 IgG)	Kaninchen	3 – 5 µg/ml	(Dorner et al., 2005)
anti-CAR (54 IgG)	Kaninchen	3 - 5 µg/ml	(Dorner et al., 2005)
anti-CAR (mAB 12-36, Zell- Überstan)	Maus	7 µg/ml	Dorner et al., 2005
anti-Flag-Tag M2	Maus	1:500	Sigma (Deisenhofen)
anti-Flag -Tag	Kaninchen	1:500	Rockland/Biomol (Hamburg)
anti-Fyn (sc-16)	Kaninchen	1:100 – 1:1.000	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)

<u>ANTIKÖRPER</u>	<u>SPEZIES</u>	<u>VERDÜNNUNG</u>	<u>REFERENZ</u>
anti-GAPDH	Kanninchen	1:1.000	(Hambsch et al., 2005)
anti-GFP	Kanninchen	1:1.000	Invitrogen (Karlsruhe)
anti-TM-Agrin TII*	Schaf	1:50 – 1:500	Neumann et al., 2001
anti-MAP2	Maus	1:1.000	Böhringer (Ingelheim)
anti-NgCAM	Maus	1:400 – 1:1.000	(Chang et al., 1990)
anti-Phosphotyrosin, clone 4G10	Maus	1:500	Biomol (Hamburg)
anti-Src (pY⁴¹⁸)	Kanninchen	1:100 – 1:1.000	Biosource/Invitrogen (Karlsruhe)
anti-Transferrin Rezeptor (TfR)	Maus	1:1.000	Zymed (San Francisco, CA,USA)

Tab. 5: Sekundärantikörper für Immunofluoreszenz und Western-Blot Analysen

<u>ANTIKÖRPER</u>	<u>AUS SPEZIES</u>	<u>VERDÜNNUNG</u>	<u>BEZUGSQUELLE</u>
anti-Kanninchen Alexa 488	Ziege	1:1.000	Molecular Probes (Leiden)
anti-Kanninchen Alexa 594	Ziege	1:1.000	Molecular Probes (Leiden)
anti-Kanninchen HRP	Ziege	1:5.000	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
anti-Maus Alexa 488	Ziege	1:1.000	Molecular Probes (Leiden)
anti-Maus Alexa 594	Ziege	1:1.000	Molecular Probes (Leiden)
anti-Maus HRP	Ziege	1:5.000	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
anti-Schaf HRP	Esel	1:5.000	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)

3.5 Plasmide

Die cDNA, welche für Vollängen-TM-Agrin (5.949bp) kodiert, war in den Vektor pcDNA4/TO (5.078 bp; Invitrogen) zwischen die EcoRI- und XbaI- Schnittstelle und in den pEGFP-N1 (4.733 bp; BD Biosciences, Clontech) zwischen die EcoRI- und BamHI- Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle einkloniert. Weiterhin wurden zwei unterschiedliche Deletionskonstrukte von TM-Agrin verwendet, die beide in den pEGFP-N1-

Vektor zwischen die EcoRI und BamHI- Schnittstelle einkloniert wurden. Bei einem cDNA Konstrukt wurde die extrazelluläre Domäne ab der siebten (TM-AgrinFD6; 1.629 bp) und bei einem weiteren Konstrukt ab der neunten Follistatin-ähnlichen Domäne deletiert (TM-AgrinFD8, 2.007 bp; freundlich überlassen von E. Porten; Porten et al.; Manuskript in Vorbereitung). Die cDNA welche für Volllängen NtA-Agrin kodiert war in den pBK-CMV Vektor (4.500 bp; Stratagene) kloniert. In den pFlagCMV-1 Vektor (4.700 bp; Sigma) war die cDNA welche für den Huhn Cocksackie-Adenovirus Rezeptor (1058 bp) kodiert, zwischen die EcoRI und Sall Schnittstelle kloniert (freundlich überlassen von F.G. Rathjen).

3.6 Zelllinien

HEK 293 Zellen (human embryonic kidney cells) stellen eine durch Infektion mit Adenoviren immortalisierte Zelllinie dar. Sie entstammen einem humanen embryonalen Nierenkarzinom (Graham et al., 1977).

CHO Zellen (chinese hamster ovary cells) wurden ursprünglich aus den Ovarien von chinesischen Hamstern gewonnen (Puck, 1958).

3.7 Tiere

Befruchtete Eier der Rasse White Leghorn (*Gallus gallus domesticus*) wurden von einer lokalen Hühnerfarm bezogen. Die befruchteten Eier wurden bei 12°C gelagert und nach Bedarf bei 37,8°C in einem Feuchtinkubator bebrütet. Die unterschiedlichen Stadien wurden als Anzahl der Tage in der Embryonalentwicklung (E) definiert.

4 METHODEN

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 (Re-) Transformation von DNA

Die verwendeten cDNA Konstrukte (siehe Abschnitt 3.5) wurden entweder in XL1-Blue Bakterien, und im Falle der chick-CAR cDNA in DH5-alpha Bakterien, des Stammes *E.coli* transformiert. Dazu wurde das Gemisch aus rekombinanten Plasmid-Vektoren und Bakterien genau 90 Sekunden (sek.) lang in ein 42° C warmes Wasserbad gegeben, wodurch das Eindringen der Plasmide in die Bakterien gewährleistet wird. Im Anschluss wurde zu den Bakterien vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und 2 Stunden (Std.) bei 37° C und 225 Umdrehungen pro Minute (rpm) inkubiert. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte mittels Ausplattieren auf Agarplatten (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 1,5% Agar, in 1 l H₂O mit 100 µg/ml Ampicillin) mit den entsprechenden Selektions-Antibiotika.

4.1.2 Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli*

Einzelne Bakterienkolonien wurden gepickt und zum Animpfen von 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet. Die Kultur wurde über Nacht bei 37° C unter ständigem Schütteln bei 225 rpm inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep 8 Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Das entstandene DNA-Pellet wurde in 50 µl deionisiertem Wasser aufgenommen. Zur Isolierung und Reinigung größerer DNA-Mengen wurde mit 500 µl der gewünschten 3 ml Bakterienkultur 200 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37° C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Hier erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe des Endo FreeTM Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers. Die Isolierung der Plasmid-DNA basiert auf der alkalischen Lyse, gefolgt von der Entfernung der bakteriellen Endotoxine und anschließender Bindung der Plasmid-DNA an den Qiagen Anionen-Austausch-Filter bei niedriger Salzkonzentration und geringem pH-Wert. Endotoxine haben einen großen Einfluss auf die Transfektion von Primärzellen und sensiblen Zelllinien mit DNA. Ein erhöhter Endotoxingehalt hat dabei eine drastische Abnahme der Transfektionseffizienz zur Folge, weshalb sie entfernt werden müssen. RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden durch anschließende Waschschrte bei mittlerem Salzgehalt entfernt. Die Plasmid-

DNA wird abschließend durch einen Puffer mit hohem Salzgehalt eluiert und durch Präzipitatbildung mit Isopropanol entsalzt und konzentriert.

4.1.3 Absorptionsmessung von DNA

Die Konzentration isolierter cDNA erfolgte photometrisch durch Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines Photometers (Eppendorf). Aus den erhaltenen Absorptionswerten wurde die Konzentration der Desoxyribonukleinsäuren berechnet. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht ca. 50 µg doppelsträngiger DNA/ml.

4.1.4 Analytischer Restriktionsverdau von DNA

Um sicherzustellen, dass es sich bei den isolierten cDNAs auch um die ursprünglich retransformierten handelt wurden analytische Restriktionen mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Größe der DNA-Fragmente mit den erwarteten Fragmentgrößen übereinstimmt. Der analytische Verdau von Plasmid-DNA wurde mit den entsprechenden Puffern und Restriktionsendonukleasen (MBI-Fermentas und New England Biolabs) bei 37° C durchgeführt. Es wurden 0,5 - 1 µg DNA mit 10 Einheiten Restriktionsendonuklease in einem Gesamtvolumen von 20 µl ein bis zwei Std. lang inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge DNA-Probenpuffer beendet und anschließend mit Hilfe eines analytischen Agarosegels überprüft.

4.1.5 Gelelektrophorese von DNA

Die DNA wurde in Agarosegelen verschiedener Konzentrationen der Größe nach in einem elektrischen Feld von ~120 V aufgetrennt. Der Prozentsatz der eingesetzten Agarose wurde dabei der Größe der zu erwartenden Fragment-Banden angepasst. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Auftragspuffer (40% Saccharose, 1 mM EDTA, OrangeG) versetzt. Als Elektrophorese Puffer wurde 1x TBE (10x TBE: 890 mM Tris; 10 mM EDTA pH 8,0; 890 mM Borsäure) verwendet. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zu 50 ml Gel. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wurden geeignete DNA-Längenstandards mit aufgetragen. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Ergebnisse mit einer digitalen Kamera dokumentiert.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Beschichtung von Deckgläsern und Petrischalen

Gelatinebeschichtung

Gelatine beschichtete TC Petrischalen wurden für die Kultivierung von Muskezellen verwendet. Dazu wurden Petrischalen der Größe 35/10mm mit einer 0,04% tigen (in ddH₂O) Gelatinelösung benetzt und 16 Std. unter der Sterilbank trocknen lassen. Die beschichteten Petrischalen konnten für zwei Wochen bei 4° C gelagert werden.

Poly-L-Lysin Beschichtung

Um Basallaminae zu isolieren, die wiederum als Substrat für Retinaexplantate dienen, wurden sterile Deckgläser (DG, 1,2 cm Ø) mit einer 0,05% tigen Poly-L-Lysin (PLL) - Lösung (MW > 300.000; in autoklaviertem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) für zwei Std. bei 37° C im Brutschrank inkubiert, danach gut mit ddH₂O gewaschen und unter der Sterilbank für 16 Std. trocknen gelassen. In dieser Weise beschichtete DG konnten zwei Wochen bei 4° C gelagert werden.

Fibronektinbeschichtung

Für immunozytochemische Untersuchungen wurden HEK 293 („human embryonic kidney“) und CHO („chinese hamster ovary“) Zellen, aufgrund ihrer schlechten Haftung an unbeschichtete DG, auf Fibronektin-beschichteten DG kultiviert. Hierzu wurden sterile DG (1,2 cm Ø) in 24-Loch-Gewebekulturschalen überführt, mit jeweils 500 µl Fibronektinlösung, bestehend aus 5 µg Fibronektin pro ml PBS überschichtet und anschließend eine Std. lang bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen dreimal je fünf Minuten (min.) lang mit PBS gewaschen und entweder sofort verwendet, oder für maximal zwei Wochen in PBS bei 4° C gelagert.

Lamininbeschichtung

Retinaexplantate wurden entweder auf Basallaminae oder auf Laminin beschichteten DG kultiviert. Ausserdem wurden primäre tectale Neurone auf Laminin beschichteten DG kultiviert. Damit Laminin besser auf den DG haftet, wurden diese zuvor mit einer PLL-Lösung (MW 70.000 – 150.000; Beschichtungsvorschrift s.o.) beschichtet. Die in der Weise vorbehandelten DG wurden anschließend mit 2 µg Laminin in PBS/cm² zwei Std. bei 37° C inkubiert. Die DG wurden 3x mit PBS gewaschen und bis zur Aussaat der tectalen Neurone bzw. der Explantierung retinaler Ganglienzellen in DMEM bei 37°C aufbewahrt.

4.2.2 Auftauen und Kryokonservierung von Zellen

Tiefgefrorene Zellen wurden unter ständigem Schütteln in einem Wasserbad bei 37° C aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 5 ml Kulturmedium (DMEM; 10% FCS 177 oder FCS Gold; 1% Pyruvat; 1% Penicillin/Streptomycin (P/S)) aufgenommen, um das im Einfriermedium befindliche Dimethylsulfoxid (DMSO) zu verdünnen. Die Zellsuspension wurde 10 min. bei 1000 rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert und das Zellsediment in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension in eine 25 cm² Kulturflasche gegeben. Zellen wurden in flüssigem Stickstoff (N₂) gelagert, falls sie nicht akut benötigt und dazu in Kultur gehalten werden mussten. Die konservierten Zellen können so über einen sehr langen Zeitraum in einer Art Kältestarre erhalten werden, in der alle Stoffwechselvorgänge nahezu zum Stillstand kommen. Hierzu wurde eine konfluent bewachsene 25 cm² Kulturflasche einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 4 ml Kulturmedium resuspendiert. Danach wurden die Zellen bei 1000 rpm für 5 min. abzentrifugiert, in 2 ml Kulturmedium (10% DMSO) aufgenommen, und in Aliquots a 1 ml in flüssigem N₂ eingefroren.

4.2.3 Kultivierung von HEK 293 und CHO Zellen

Die HEK 293 und CHO Zellen wurden bei 37° C in einem CO₂-Inkubator mit 10% CO₂-Gehalt und 98 % wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Je nach Teilungsrate wurden die Zellen alle drei bis vier Tag passagiert. Dazu wurden die Zellen mechanisch vom Boden der 25 cm² Kulturflasche abgelöst und im Verhältnis 1:4 – 1:20 in eine neue Kulturflasche überführt, die danach mit Kulturmedium auf 6 ml aufgefüllt wurde.

4.2.4 Zellzahlbestimmung

Bei Transfektionen kann die Dichte (Anzahl) der Zellen auf den einzelnen DG eine wichtige Rolle spielen. Um die genaue Zellzahl für das Aussäen zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst nach einmaligem waschen mit PBS in 2 ml Kulturmedium mit einer abgeflamten Pasteur Pipette resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurde in eine Neubauersche Zählkammer gegeben. Die Zellzahl von vier Quadranten wurde durch manuelles Auszählen unter dem Mikroskop bestimmt und ein Mittelwert berechnet. Der Mittelwert der ausgezählten Zellen wurde mit 10⁴ multipliziert und gibt die Anzahl an Zellen in 1 ml der Zellsuspension an.

4.2.5 Transfektion und Nukleofektion von Zellen

Kalzium-Phosphat Transfektion

Zellen die mit Kalzium-Phosphat als Transfektionsreagenz transfiziert werden nehmen die Fremd-DNA in Form von feinkörnigen DNA-Kalzium-Phosphat-Co-Präzipitaten endozytotisch auf. Die Präzipitate bilden sich, wenn man eine DNA/ CaCl_2 Lösung mit einer Lösung mischt, die Phosphat-Ionen enthält (Chen und Okayama, 1987). Die Transfektionslösung besteht aus folgenden Komponenten: 420 μl 0,05x TE-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA) wurden mit 7,5 μg des jeweiligen cDNA-Konstruktes und 60 μl sterilem 2 M CaCl_2 vermischt und vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde tropfenweise 480 μl 2x HBS (280 mM NaCl; 50 mM Hepes; 1,5 mM Na_2HPO_4) hinzugegeben. Die Kristallbildung erfolgte nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. 50 μl eines Transfektionsansatzes wurden pro Vertiefung einer 24-Loch-Gewebekulturschale eingesetzt. Das entspricht ca. 0,3125 μg DNA pro Vertiefung. Nach 24 stündiger Inkubation der transfizierten Zellen bei 37° C im CO_2 -Inkubator, wurde das Medium gewechselt und die Zellen erneut für 24 Std. in den CO_2 -Inkubator gestellt. Danach konnten die Zellen für immunozytochemische Experimente verwendet werden.

SuperFect Transfektion

Die SuperFect Transfektions-Reagenz (Qiagen) ist ein speziell konstruiertes, aktiviertes Dendrimer mit einer definierten kugelförmigen Struktur (Tang et al., 1996). Der SuperFect DNA-Komplex besitzt eine positive Nettoladung und kann an negativ geladene Rezeptoren in der Zellmembran binden und in das Zellinnere eindringen. In der Zelle puffert SuperFect das Lysosom und schützt die DNA vor dem Abbau durch lysosomale Nukleasen. Die Transfektion erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

Amaya Nukleofektion

Für die Überexpression von cDNA Konstrukten in tectalen Neuronen wurde die Technologie der Firma Amaya verwendet, welche speziell für primäre und schwer transfizierbare Zellen geeignet ist. Die Methode der Nukleofektion von Amaya kombiniert die Elektroporation mit optimierten Zelltyp-spezifischen Puffern, um eine hohe Transfektions- und Überlebensrate zu gewährleisten. Die Nukleofektion der tectalen Neurone wurde mit dem Chicken Neuron Nucleofector® Kit, der Nukleofektor I Maschine und dem gespeicherten Programm G-13 nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Entgegen der Anweisung des Herstellers wurden pro Transfektionsansatz 5 μg cDNA eingesetzt. Im Anschluss an den Nukleofektionsvorgang wurden 400.000 Zellen auf vier mit PLL und Laminin beschichtete DG in einer 35 mm Petrischale verteilt. Nach vierstündiger Inkubation der Zellen auf den DG

wurde Kulturmedium 1 (RPMI 1640, 10% FCS, 1% P/S, 1% stabiles Glutamat) gegen Kulturmedium 2 (Neurobasal A, 2% B27 supplement, 1% stabiles Glutamat, 1% P/S) ausgetauscht. Nach weiteren 72 Std. konnten die primären Zellen für immunozytochemische Untersuchungen verwendet werden.

4.2.6 Quantitative Auswertung der Ausläuferbildung

Zur quantitativen Auswertung der Ausläufer-induzierenden Aktivität von TM-Agrin wurden HEK 293 Zellen wie in 4.2.5 beschrieben transfiziert und anschließend wie in Abschnitt 4.2.13 erörtert mit anti-Agrin (#46 IgG) oder anti-TM-Agrin Ak fluoreszenzmarkiert. Die Zellzahl wurde über die DAPI Markierung ermittelt. Die Morphologie der Zellen wurde anhand der anti-Agrinfärbung (#46 IgG) bzw. anti-TM-Agrinfärbung und der Phalloidinmarkierung untersucht. Die jeweiligen Konstrukte wurden, in Bezug auf ihre Fähigkeit Ausläufer zu induzieren, als positiv gewertet wenn die transfizierten Zellen mehr als zehn Fortsätze bildeten, oder wenige Fortsätze hatten, die aber mindestens doppelt so lang waren, wie der Zelldurchmesser. Transfizierte Zellen die feine Netzwerke von Ausläufern ausbildeten, wurden ebenfalls als positiv gewertet. Sehr wenige kurze Fortsätze fanden sich auch in untransfizierten Zellen, in Zellen die mit pcDNA4/TO Leervektor, sowie in Zellen die mit NtA-Agrin, transfiziert wurden. Es wurden bevorzugt einzeln liegende Zellen ausgezählt, da in Zellverbänden vorliegende Zellen keine klaren Aussagen über die Länge und Form der Ausläufer. Die Ergebnisse der statistischen Auswertungen wurden als Mittelwert $\pm$ S.E.M. (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die Anzahl der unabhängigen Experimente betrug mindestens 3.

4.2.7 Kultivierung von Muskelzellen

Die Oberschenkel von E 11 – 12 Hühnern wurden in Hanks Balanced Salt Medium (HBSS) isoliert, enthäutet und von Knochen und Sehnen getrennt. Die Oberschenkelmuskulatur wurde anschließend in 20 ml modifiziertem Puck's Puffer (10% 10x Puck's Puffer und 1% Glucose (11g/100ml ddH₂O) in ddH₂O) mit 10 % 1x Trypsin für 15 min. bei 37° C im Wasserbad verdaut. Der Verdau überflüssiger Zellreste wurde durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium (MEM, 10% HS, 1% P/S, 1% stabiles Glutamat) gestoppt. Danach erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 3000 rpm. Das Zellpelet wurde in 10 ml Kulturmedium mit 2% CEE (chick embryo extract; E 11 – 12 Hühnerkörper durch 50 ml Spritze drücken, gleiches Volumen Kulturmedium zugeben, mischen, und 30 min. bei RT inkubieren. Dann 20 min. bei 3000 rpm zentrifugieren und mittlere Phase verwenden.) tituiert. 250.000 Zellen wurden je Gelatine beschichtete Petrischale ausgesäht und im CO₂-

Inkubator kultiviert. Nach 24 Std. wurde das Kulturmedium abgesaugt, die primären Myoblasten mit CaPO_4 transfiziert und in 1,5 ml Kulturmedium mit 1% CEE und 1% Ara-C (Cytosin β -D-Arabinofuranosidhydrochlorid), welches die DNA Replikation inhibiert, weiter kultiviert. Dadurch wird das Überwachsen der Myoblasten durch die sich schneller teilenden Fibroblasten verhindert. Nach 24 Std. erfolgte dann die Transfektion ausgesähter Myoblasten mittels der Kalzium-Phosphat Transfektionsmethode (siehe Abschnitt 4.2.5). Weitere 48 Std. danach wurden die transfizierten Myoblasten immunozytochemisch analysiert.

4.2.8 Präparation von Basallaminae

Basallaminae sind das physiologische Substrat retinaler Ganglienzellen und wurden verwendet um das Auswachsen retinaler Ganglienzellen aus Retinaexplantaten zu garantieren. Um Basallaminae zu isolieren wurde zunächst Retinae in HBSS aus 10 – 12 Tage alten Hühnerembryonen heraus präpariert (Halfter et al., 1987). Die Retinae wurden dann Kleeblatt-ähnlich eingeschnitten und mit der skleralen Seite faltenfrei auf schwarzen Nitrozellulosefiltern ausgebreitet. Danach wurden die Retinae mit saugfähigem Papier an der Nitrozellulose immobilisiert. Anschließend wurden die auf der schwarzen Nitrozellulose befindlichen Retinae mit der vitrealen Seite auf zuvor mit PLL beschichtet DG gelegt und dort leicht antrocknen lassen. Die Nitrozellulose wurde abgenommen und die Basallaminae mit den anhaftenden Endfüßen von Müller-Glia Zellen verblieben auf den beschichteten DG. Um Zellreste wie z.B. die Endfüße von Müller-Glia Zellen zu entfernen wurden die auf den DG haftenden Basallaminae für eine Std. mit HBSS (1% 1x Triton) inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal mit Kulturmedium (DMEM; 10% FCS 177 oder FCS Gold; 1% Pyruvat; 1% P/S) gewaschen und letztendlich die Basallaminae in Kulturmedium bei 37° C im CO_2 -Inkubator kultiviert (Halfter et al., 1987).

4.2.9 Explantate retinaler Ganglienzellen

Die Retinae wurden zunächst wie in Abschnitt 4.2.8 beschrieben präpariert. Damit die Axone retinaler Ganglienzellen aus den Explantaten auswachsen können, wurden die auf schwarzen Nitrozellulose Filtern befindlichen Retinae mit einer Rasierklinge senkrecht zur Fissur in naso-temporaler Orientierung in ca. 400 μm breite Streifen geschnitten (Halfter et al., 1983). Diese Streifen wurden mit wenig Kulturmedium (DMEM; 10% FCS 177 oder FCS Gold; 1% Pyruvat; 1% P/S) benetzt und danach mit der vitrealen Seite auf Basallamina oder Laminin beschichtete DG gelegt. Die Explantate wurden sodann für zwei bis drei Std. im CO_2 -Inkubator an die Substrate anwachsen gelassen. Darauf folgend wurden die Explantate mit 1 ml Kulturmedium bedeckt. Das Auswachsen der Axone erfolgte innerhalb von 16 Std.

4.2.10 Induktion von Ausläufern

Um die Bildung von Ausläufern auf Axonen retinaler Ganglienzellen zu induzieren wurden diese nach dem Auswachsen für 3 Std. mit dem anti-Agrin Ak (#46 IgG) in einer Verdünnung von 1:500 in Kulturmedium (siehe Abschnitt 4.3.8) bei 37° C im CO₂-Brutschrank inkubiert (Annie et al., 2006). Die Zellen standen dann für immunozytochemische und biochemische Untersuchungen zur Verfügung.

4.2.11 Präparation von tektalen Neuronen

Tektale Neurone von E7 Hühnern wurden mit verschiedenen cDNA Konstrukten mittels der Amaxa Technologie nukleofektiert (siehe Abschnitt 4.2.5). Dazu mussten zunächst die Tekta der Hühner in 37° C warmem PBS heraus präpariert werden. Anschließend wurden die Tekta mechanisch zerkleinert und in 5 ml PBS mit 0,04% Trypsin 15 min. lang bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Der Inkubationsschritt mit Trypsinhaltiger Lösung diente dazu tektale Zellen zu vereinzeln. Durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium 1 (RPMI 1640, 10% FCS, 1% P/S, 1% stabiles Glutamat) wurde die Eiweißzersetzung durch Trypsin und somit der Vereinzlungsprozess tektaler Zellen gestoppt. Daraufhin wurden die tektalen Zellen 5 min. bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 2 ml Kulturmedium 1 mit abgeflamten Pasteur Pipetten resuspendiert. Die letzten beiden Schritte wurden insgesamt dreimal wiederholt um die Zellen so gut wie möglich für die anschließende Nukleofektion zu vereinzeln. Im Anschluss wurden die Zellen in insgesamt 5 – 6 ml Kulturmedium 1 überführt und ausgezählt. Die nachfolgende Nukleofektion, für die in etwa 4×10^6 Zellen pro Ansatz erforderlich waren, erfolgte mit der Nukleofektor I Maschine und dem Chicken Neuron Nucleofector® Kit der Firma Amaxa wie in Abschnitt 4.2.5 beschrieben.

4.2.12 Verwendung von Inhibitoren und Aktivatoren

Nachstehend werden die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren und deren Inkubationsdauer aufgelistet:

NAME	FUNKTION	INKUBATION
BAPTA-AM (1,2-Bis(2-Aminophenoxy)ethan- N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(Acetoxyethyl ester))	inhibiert intrazelluläres Kalzium	10 min. vor und während der Ausläufer Induktion
CoCl	Unselektiver Kalziumkanal Blocker	Parallel zur Ausläufer Induktion

NAME	FUNKTION	INKUBATION
<i>db-cAMP</i> (dibutyryl zyklisches Adenosin Monophosphat)	Zellpermeables Analogon zu cAMP	30 min. vor und während der Ausläufer Induktion
<i>db-cGMP</i> (dibutyryl zyklisches Guanosin Monophosphat)	Zellpermeables Analogon zu cGMP	30 min. vor und während der Ausläufer Induktion
<i>Methyl-β-Cyclodextrin</i>	Entfernt akut Cholesterol aus Plasmamembranen	1 h vor und während der Ausläufer Induktion
<i>PDMP</i> (($\pm$)- <i>threo</i> -1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1	Glucosylceramide Synthase Inhibitor	16 h vor und während der Ausläufer Induktion
<i>PD98059</i> (2'-Amino-3'-Methoxyflavon)	Inhibitor der MAP Kinase Kinase	1 h vor und während der Ausläufer Induktion
<i>PP1</i>	Inhibitor von Src-Kinase Familie Mitgliedern	1 h vor und während der Ausläufer Induktion
<i>Rp-cAMPS</i> <i>Triethylammonium Salz</i>	Inhibiert die Aktivierung von cAMP	3 h
<i>Rp-8-[(4-Chlorophenyl)thio]-cGMPS</i> <i>Triethylammonium Salz</i>	Inhibiert die Aktivierung von cGMP	3 h
<i>Wortmannin</i>	Inhibitor der Phosphatidyl-Inositol (PI) 3 Kinase	30 min. vor und während der Ausläufer Induktion

4.2.13 Immunozytochemie

In dieser Arbeit wurden die bereits zuvor beschriebenen CHO Zellen, HEK 293 Zellen, primäre Myoblasten, retinale Ganglienzellen und tectalen Neurone immunozytochemisch analysiert. Dazu wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen, um das spezifische Kulturmedium zu entfernen und danach sieben min. lang mit 400 μ l 4% Paraformaldehyd-Lösung (4% PFA in PBS) bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen und Petrischalen dreimal je fünf min. mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung wurden die Zellen 20 min. lang bei RT mit Blocklösung (10% FCS in PBS) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken und um eventuell unzugängliche Epitope freizulegen. Die primären Antikörper wurden in Blocklösung verdünnt über Nacht (ÜN) auf den Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal je fünf min. mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen sekundären Antikörpern für 45 min. in Dunkelheit bzw. mit fluoreszenz-markiertem Phalloidin-Alexa488 oder fluoreszenzmarkiertem Cholera-Toxin. Um die einzelnen Zellen besser im Verband identifizieren zu können wurde dann für zehn min. mit dem 1:200 in PBS verdünnten DNA-

spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt. DAPI färbt spezifisch nukleäre DNA. Anschließend wurden die Zellen zweimal je zehn min. mit PBS gewaschen. Die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden zum Abwaschen von verbliebenem Puffer kurz in destilliertes Wasser und danach in -20° C kaltes Ethanol getaucht. Schließlich wurden die Deckgläschen mit Eindeckmedium (Citifluor Fluorescent Mounting Medium) auf Objektträgern eingedeckelt. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit Hilfe von selektiven Fluoreszenzfiltern unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRA) betrachtet.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Zelllyse

Konfluent mit Zellen bewachsene 100 mm Kulturschalen transfizierter bzw. nicht transfizierter HEK 293 Zellen oder sechs DG (1,2 cm Ø) bewachsen mit induzierten oder nicht induzierten Axonen retinaler Ganglienzellen wurden zunächst mit 4° C kaltem PBS gewaschen. Die anschließende Lyse der Zellen erfolgte in 500 µl Lysepuffer (50 mM Tris-Base pH 7,4, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton-X-100, 1 Tablette Proteaseinhibitor complete EDTA-free/25 ml und 10 µl Phosphataseinhibitor Cocktail 1 und 2/ml) für eine Std. auf Eis. Kanülen verschiedener Größe dienten dazu die Lysate zu homogenisieren und zudem die genomische DNA zu scheren. Die entstandenen Homogenisate wurden, falls sie nicht für die Isolierung Triton-X100-unlöslicher Membranfraktionen oder TCA Fällung vorgesehen waren, im Verhältnis 1:1 mit Natriumdodecyl-sulfat- (SDS) Probenauftragspuffer (100 mM Tris-Cl pH 6,8, 20% Glycerin, 4% (w/v) SDS, 10% β-Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau) versetzt und bei 95° C für fünf min. hitzedenaturiert. Der Auftrag der Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel erfolgte direkt im Anschluss. Anderenfalls konnten die Proben bis zu einer Woche bei -80° C gelagert werden.

4.3.2 Trichloressigsäure Fällung

Die Trichloressigsäure (TCA) Fällung diente der Aufkonzentrierung von Proteinen im Zelllysate. Die Proben wurden durch Zugabe einer wässrigen TCA Lösung (40% w/v), bis zum Erreichen der Endkonzentration von 10% TCA in den Proben, 20 min. bei 4° C gefällt. Anschließend wurde das TCA-Proteingemisch für 15 min. bei 14.000 rpm und 4° C zentrifugiert. Das entstandene Proteinpellet wurde mit -20° C kaltem Aceton gewaschen und bei 14.000 rpm für fünf min. (4° C) abzentrifugiert. Der Waschschritt wurde insgesamt 2x

wiederholt. Das Pellet wurde danach zwei min. bei 56° C im Heizblock getrocknet und schlussendlich in SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen

4.3.3 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese

Bei der Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Das anionische Detergenz SDS verleiht Proteinen eine negative Ladung, die proportional zum Molekulargewicht ist. Dadurch wird das Auftrennen der Proteine in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Größe ermöglicht. Alle SDS-Polyacrylamidgele bestanden aus einem 4% tigem Sammelgel und einem Trenngel von variabler Größe (6% - 16%). Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V in einer vertikalen Elektrophoreskammer (Sigma, Deisenhofen) gefüllt mit Puffer (25 mM Tris-Base pH 8,3, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS). Anhand der Größenstandards Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus und Page Ruler™ Unstained Protein Molecular Weight Marker (beide MBI Fermentas, St.-Leon) konnte das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmt werden.

4.3.4 Coomassiefärbung

SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Coomassie Brilliant Blue G250 der Firma Roth (Roti®-Blue) nach Anweisung des Herstellers gefärbt. Durch seine kolloidalen Eigenschaften bindet der Farbstoff mit hoher Spezifität an Proteine und nur minimal an die Gelmatrix. Je nach Verwendungszweck wurden die gefärbten Gele in 4% tige Glycerinlösung überführt und auf einem Geltrockner mit Kühlfalle eine Std. lang bei 60° C getrocknet. Da die Proteine jedoch aufgrund des kolloidalen Coomassie auch ohne Gelfixierung angefärbt werden können, konnte zudem im Anschluss an die Färbung noch ein Western Blot durchgeführt werden.

4.3.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine extrem empfindliche Methode zum Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen. Die Sensitivität ist 100-fach höher als die der Coomassiefärbung. Für die Silberfärbung musste das SDS-Polyacrylamidgel erst einmal in 50% tigem Ethanol für 15 min. fixiert werden. Danach wurden die Gele 15 min. in der Färbelösung inkubiert (Färbelösung: A: 0,8 g AgNO₃ in 4 ml H₂O mischen mit B: 2,1 ml 1N NaOH und 1,6 ml NH₃ und auf 100 ml mit H₂O auffüllen). Darauf folgend wurden die Gele mit H₂O gewaschen und in Entwicklerlösung (125 mg Zitronensäure in 250 ml H₂O und 0,8 ml 37% tiges

Formaldehyd) überführt bis deutliche Banden detektiert werden konnten. Der Entwicklungsvorgang wurde dann sofort durch Zugabe von 50% Ethanol (EtOH) und 10% Essigsäure in H₂O gestoppt. Die Gele wurden in eine 20% tige Glycerin Lösung überführt und auf einem Gelrockner mit Kühlfalle für eine Std. bei 60° C getrocknet.

4.3.6 Western-Blot Analyse

Ein Western-Blot ist eine Methode um bestimmte Proteine mit jeweils spezifischen Antigenen nachzuweisen. Die Proteine wurden deshalb nach der Auftrennung in der SDS-PAGE auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran durch Anlegen einer elektrischen Spannung mittels einer Naßblott Apparatur (Peqlab, Erlangen) übertragen. Der Transfer der Proteine erfolgte in Lämmli-Puffer (25 mM Tris-Base pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) mit 20% EtOH. Die Stromstärke und die Übertragungsdauer wurden abhängig von dem Molekulargewicht der zu transferierenden Proteine gewählt (200 – 480 mA; eineinhalb bis vier Std.). Unspezifische Protein-bindestellen wurden durch Inkubation mit 4% Magermilchpulver in TBST (TBS mit 0,1% Tween 20 (v/v); TBS: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) oder 3% Rinder-Serumalbumin (BSA) in TBST für mindestens 30 min. abgesättigt. Die PVDF Membranen wurden über Nacht bei 4° C oder zwei Std. bei RT mit primären Antikörpern und nach 3 Waschschritten je zehn min. mit PBST für eineinhalb Std. bei RT mit einem Spezies-spezifischen an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion peroxidasekonjugierter Sekundärantikörper erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Detektionsbaukastens (SuperSignal® West Pico, Pierce, Bonn) nach Vorschrift des Herstellers und anschließender Exposition der PVDF Membran auf einem Röntgenfilm. Die Expositionsdauer betrug dabei je nach Intensität des Signals zwischen wenigen sek. bis hin zu vier Std..

4.3.7 Ponceau S Färbung

Molekulargewichtsstandards wurden mit einer Ponceau S Lösung (2% Ponceau S, 30% TCA, 30% Sulfosalicylsäure in H₂O) nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF Membran gefärbt. Dazu wurden die Membranen für ca.drei bis fünf min. in Ponceau S Lösung inkubiert und anschließend mehrmals mit ddH₂O gewaschen.

4.3.8 Koimmunopräzipitation

Das vollständige Gehirn wurde aus E7 Hühnern präpariert (zehn Gehirne pro Ansatz), in 1 ml 4° C kaltem Lysepuffer aufgenommen, mittels eines Dounce-Potters homogenisiert und im Anschluss 30 sek. lang im Ultraschallbad behandelt. Weiterhin erfolgte die Lyse wie

in Abschnitt 4.3.1 beschrieben. Ein Teil des Ursprungslysates wurde zur Kontrolle aufbewahrt. Um das Lysat vor der Immunfällung von unspezifisch bindenden Komponenten zu befreien wurde es mit 100 µl Poly-A-Sepharose Kügelchen (in Lysepuffer) für eine Std. unter Rotation bei 4° C inkubiert. Danach wurden die Kügelchen bei 1.000 upm abzentrifugiert und der Überstand über Nacht mit dem #46 IgG bei 4° C unter ständiger Rotation inkubiert. Anschließend wurden wiederum 100 µl Poly-A-Sepharose Kügelchen zu dem Lysat/#46 IgG-Gemisch gegeben und zwei Std. bei 4° C unter Rotation inkubiert. Der so entstandene Immunkomplex wurde bei 1.000 rpm abzentrifugiert, 4x mit Lysepuffer und einmal mit PBS bei 4° C gewaschen. Abschließend wurden der Immunkomplex mit 60 µl SDS-Probenauftragspuffer versetzt und fünf min. bei 95° C aufgekocht.

4.3.9 Isolierung von Triton-X100-unlöslichen Glycosphingolipid-reichen Membranfraktionen

Triton-X100-unlösliche Glycosphingolipid-reiche Membranfraktionen („lipid rafts“) reichern sich aufgrund ihrer Unlöslichkeit bei 4° C in nicht-ionischen Detergenzien im Sucrosetufengradient bei geringer Dichte an. Lipid rafts wurden aus transient transfizierten HEK 293 Zellen und induzierten sowie undinduzierten retinalen Ganglienzellen von E7 Hühnern isoliert. Die im Folgenden dargestellten Arbeitsschritte wurden bei 4° C durchgeführt. Zunächst wurden Lysate wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben hergestellt. Die Lysate wurden mit OptiPrep® Density Gradient Medium (Sigma, Deisenhofen) auf eine Endkonzentration von 40% OptiPrep® Density Gradient Medium in dem Gemisch eingestellt, in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mit einem OptiPrep® Density Gradient Medium Stufengradient, bestehend aus einer 30% tigen und einer 5% tigen Phase, überschichtet. Anschließend erfolgte eine 3 stündige Zentrifugation bei 4° C und 55.000 rpm im Beckmann TLS 55 Rotor (gemacht wie in Simons und Ikonen; 1997). Lipid rafts flotieren aufgrund ihrer Unlöslichkeit in Detergenzien im Gradient zu Bereichen geringerer Dichte, wohingegen in Detergenzien lösliche Membranbereiche zum Boden pelletiert werden. Nach der Zentrifugation wurden acht, in Bezug auf ihr Volumen, gleich große Fraktionen von oben nach unten abgenommen. Um vor allem die in lipid raft Fraktionen befindlichen Proteine anzureichern wurde die Sucrosekonzentration in den jeweiligen Fraktionen mit ddH₂O (mit complete EDTA free Protease Inhibitoren) verdünnt und die darin befindlichen Proteine eine Std. lang bei 4° C und 55.000 rpm im Beckmann TLA 55 Rotor zentrifugiert bzw. pelletiert. Die Proteinpellets wurden schließlich in 60 µl SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen und denaturiert.

4.3.10 Affinitätsreinigung von Immunoglobulinen (IgG)

Die Aufreinigung von IgG Antikörpern erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Poly-A-Sepharose Kügelchen die an einer Säulenmatrix immobilisiert wurden. Zunächst wurde die Protein A Säule mit 20 ml Puffer A (0,01 M Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,02% Natriumazid (NaN_3)) equilibriert. Nach Zugabe des Präimmunserums aus Kanninchen wurde die Säule mit 30 ml Puffer A gewaschen und anschließend die IgGs mit 2 ml Puffer B (0,2 M Glycin-HCl pH 2,5 – 3, 0,5 M NaCl, 0,02% NaN_3) in Tris-HCl pH 7,5 eluiert (Eluat/Tris-HCl im Verhältnis 10:1). Die Säule konnte nach Equilibrierung mit 20 ml Puffer bei 4° C gelagert werden. Das Eluat wurde 16 Std. mit Slide-A-Lyzer gegen PBS dialysiert und danach mittels Zentrifugation in Centrikon Röhrchen eingeengt.

4.3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gesamten Daten wurde mit der Graph Pad Prism Software Version 4.03 unter Verwendung des students *t*-Test und des one-sample *t*-Test erstellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Messreihen wurden mit Sternchen versehen, die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wurde folgendermassen definiert:

unter 5% ($p < 0,05$; *) = statistisch signifikant

unter 1% ($p < 0,01$; **) = statistisch hoch signifikant

unter 0,01% ($p < 0,001$; ***) = statistisch extrem signifikant

5 ERGEBNISSE

5.1 TM-Agrin induziert die Bildung von Ausläufern in nicht-neuronalen Zellen

Die Multimerisierung von TM-Agrin durch polyklonale Antikörper (Ak) oder Überexpression von TM-Agrin Protein induziert auf Axonen und Dendriten des PNS und ZNS die Bildung Filopodien-ähnlicher Ausläufer (Annies et al., 2006; McCroskery et al., 2006). Um festzustellen, ob sich diese Ausläufer auch auf nicht-neuronalen Zellen induzieren lassen, wurden menschliche Nierenzellen (human embryonic kidney cells, HEK 293) transient mit Hühner Volllängen TM-Agrin cDNA transfiziert (Abb.3, C-C''',D, E).

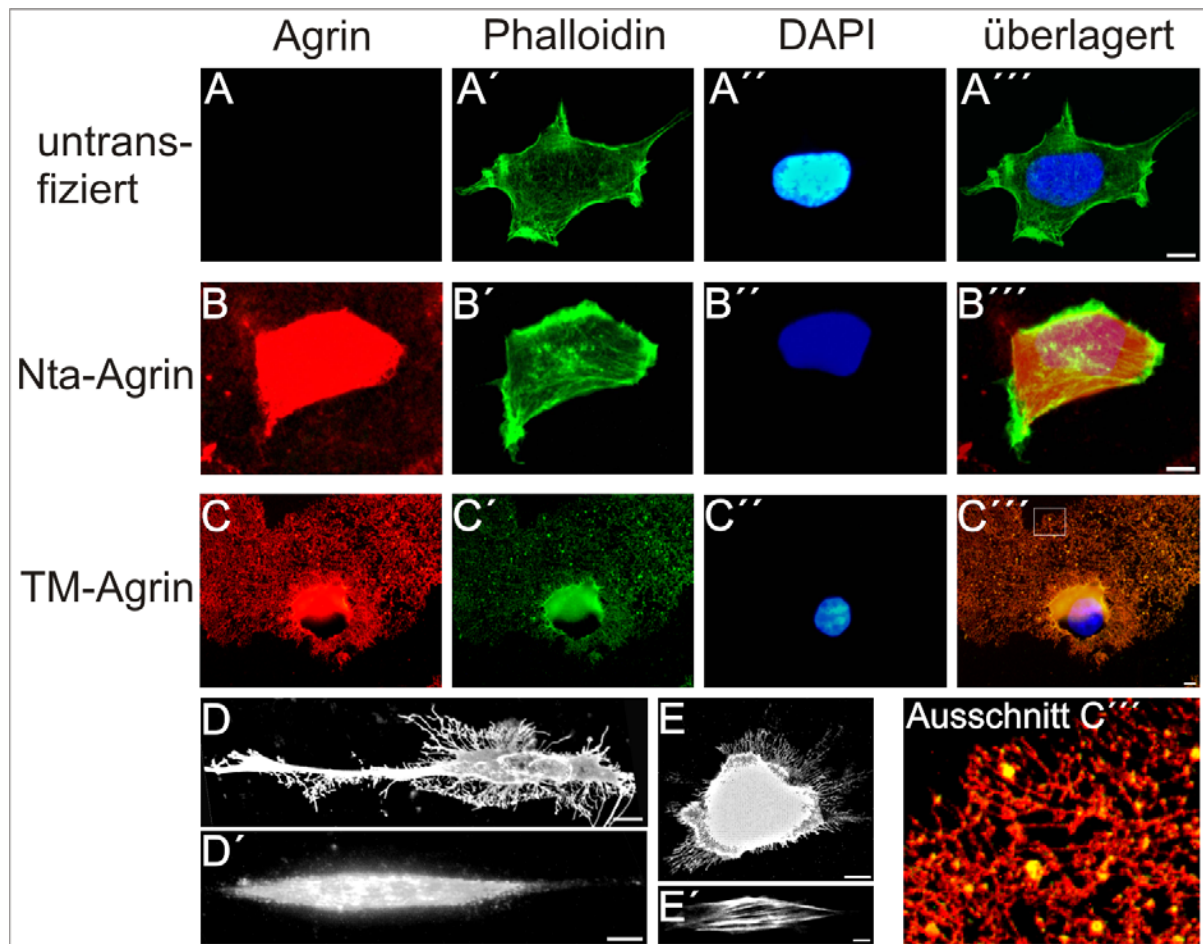


Abb.3: Heterologe Expression von TM-Agrin. HEK 293 Zellen (A-C'''), primäre Myoblasten (D, D') und CHO Zellen (E, E') wurden entweder nicht behandelt (A-A''', E') oder transient mit cDNA, die für NtA-Agrin (B-B''', D') oder TM-Agrin (C-C''') kodiert transfiziert. Die Zellen wurden mit fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin (A', B', C', E'), anti-Agrin Antikörpern (A, B, C, D, D', E) und DAPI, welches an nukleäre DNA bindet, gefärbt. Die mit TM-Agrin cDNA transfizierten Zellen bildeten im Gegensatz zu untransfizierten oder mit NtA-Agrin transfizierten Zellen zahlreiche Ausläufer entlang der Zelloberfläche aus. Die Aktin Filamente erstrecken sich bis hin zu den Ausläuferspitzen (Ausschnitt C'''). (Skalierungsbalken = 10µm)

Um auszuschliessen, dass die Ausläuferbildung nur durch den Transfektionsprozess induziert werden kann oder dass die sekretierte Agrin Isoform (NtA-Agrin) die Bildung von Ausläufern induzieren kann, wurden parallel kultivierte HEK 293 Zellen mit löslichem NtA-Agrin transfiziert (Abb.3, B-B''). Transfizierte und untransfizierte HEK 293 wurden mit fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin (A'-C'), welches selektiv an filamentöses Aktin bindet, und anti-Agrin Ak (A-C) detektiert. Zellen, die mit NtA-Agrin transfiziert wurden (Abb.3, B-B'') behielten ebenso wie untransfizierte Zellen (Abb.3, A-A'') ihre rautenförmige Morphologie bei und bildeten keine Ausläufer aus. Im Gegensatz dazu resultierte die Expression von TM-Agrin in der Ausbildung zahlreicher Aktin- (Abb.3, C) und Agrin-haltiger (Abb.3, C') Ausläufer. Dies zeigt, dass Überexpression von TM-Agrin nicht nur auf Neuronen, sondern auch auf nicht-neuronalen Zellen Ausläufer induzieren kann.

Um die spezifische Ausläufer-induzierende Aktivität von Agrin zu bestimmen, wurden transfizierte HEK 293 Zellen anhand der im Methodenteil spezifizierten Kriterien ausgewertet. Bei Zellen die mit Vollängen TM-Agrin cDNA transfiziert wurden, zeigten sich bei ca. 85% der transfizierten Zellen Ausläufer, wohingegen nahezu keine Zelle, die mit Vollängen NtA-Agrin cDNA transfiziert wurde, Ausläufer ausbildete (Abb.4).

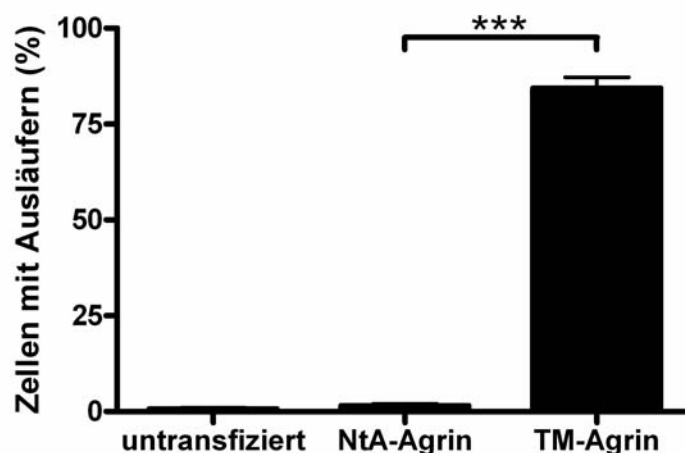


Abb.4: Quantifizierung der heterologen Expression in HEK 293 Zellen. HEK 293 Zellen wurden entweder gar nicht (untransfiziert), mit NtA-Agrin oder TM-Agrin cDNA transient transfiziert. Nach 24 Std. wurden die Zellen fixiert und anschließend fluoreszenzmarkiert. Zur genaueren Bestimmung der Anzahl transfizierter Zellen wurden diese zusätzlich mit DAPI markiert. Es wurde der prozentuale Anteil von Zellen, die Ausläufer bilden ermittelt. Die Fehlerbalken entsprechen +/- SEM mit N=4. *** $p < 000,1$; unpaired t -test.

Im Gegensatz zu den durch TM-Agrin induzierten Filopodien-ähnlichen Ausläufern auf Axonen des ZNS, bildeten die Ausläufer auf HEK 293 Zellen keine Wachstumskegel an ihren Spitzen aus und zogen sich auch nicht zurück, sondern überwucherten bei längerer Kultivierung das gesamte Deckglas. Übereinstimmend jedoch enthielten sowohl die Filopodien-ähnlichen Ausläufer auf Axonen des ZNS als auch auf HEK 293 Zellen

zytoskeletale Elemente wie z.B. Aktin, welches sich bis hin zu den Ausläuferspitzen zog (Abb.4, Ausschnitt C'').

Die Ausbildung zahlreicher Aktin-enthaltender Ausläufer nach TM-Agrin Überexpression war nicht nur auf HEK 293 beschränkt. Die Transfektion von TM-Agrin cDNA in weitere nicht-neuronale Zellen wie z.B. COS-7 aus Affen, PC-12 Zellen aus Ratten (nicht gezeigt), primäre Myoblasten aus Hühnern (Abb.3, D) und CHO Zellen aus Hamstern (Abb.3, E) führte ebenfalls zur Entstehung von Ausläufern im Gegensatz zu untransfizierten (Abb.3, E') oder mit NtA-Agrin transfizierten Zellen (Abb.3, D').

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die erhaltenen Resultate in Übereinstimmung mit früheren Veröffentlichungen (McCroskery et al., 2006) zeigen, dass die Überexpression von TM-Agrin zur Ausbildung von Ausläufern nicht nur in neuronalen sondern auch in nicht-neuronalen Zellen führt. Zudem ist die Ausläuferbildung Spezies- und Zelltyp unabhängig.

5.2 TM-Agrin und lipid rafts

5.2.1 TM-Agrin ist in biochemisch isolierten lipid rafts aus nicht-neuronalen und neuronalen Zellen lokalisiert

Ein wesentliches Ziel der Arbeit war die Analyse des intrazellulären Mechanismus der zur Bildung der Filopodien-ähnlichen Ausläufer führt. Die Spezies- und Zelltyp-Unabhängigkeit der Wirkung von TM-Agrin deutet auf einen Mechanismus hin, der weit verbreitet und Spezies übergreifend ist. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass lipid rafts eine Rolle spielen könnten. Lipid rafts sind distinkte Bereiche der Zellmembran, die sich in ihrer Protein und Lipid Zusammensetzung von dem Rest der Zellmembran unterscheiden (Brown und London, 1998; Simons und Ikonen, 1997). Lipid rafts spielen eine wichtige Rolle bei vielen Signalwegen und konnten in nahezu allen untersuchten Spezies und Zelltypen detektiert werden (Simons und Toomre, 2000). Ein Charakteristikum von lipid rafts ist, dass sie sich aufgrund ihrer Detergenzienunlöslichkeit bei 4° C im Sucrosegradient bei Fraktionen geringer Dichte (etwa 15 % Sucrose) anreichern lassen.

Um herauszufinden ob TM-Agrin mit lipid rafts assoziiert, wurden HEK 293 Zellen 24 Stunden nach transients Transfektion mit Vollängen TM-Agrin oder TM-AgrinFD6 cDNA, einem Deletionskonstrukt, dass nicht mehr in der Lage ist die Bildung von Ausläufern zu induzieren (Abb.14, D), bei 4 °C in 1% Triton X-100 solubilisiert und die Proteine über einen Stufengradient aufgetrennt. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden acht, in Bezug auf das Volumen, gleich große Fraktionen beginnend von der geringsten Dichte (Fraktion 1)

bis hin zur höchsten Dichte (Fraktion 8) abgenommen und für die SDS-PAGE vorbereitet. Lipid rafts reichern sich im Sucrosegradient, wie bereits zuvor erwähnt, in Fraktionen geringer Dichte (Fraktion 1 und 2, ca. 15% Sucrose) an, wohingegen sich Nicht-lipid raft Proteine in Fraktionen mit einer höheren Sucrosedichte (Fraktionen 3 – 8) anreichern. Im Anschluss an die SDS-Page wurden die SDS-Gele geblottet und mit Antikörpern gegen Fyn, TM-Agrin, Coxsackie-Adenovirus Rezeptor (CAR), Aktin und Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) inkubiert. Fyn, ein Mitglied der Src-Familie Kinasen, konnte in den transient mit TM-Agrin und TM-AgrinFD6 transfizierten Zellen in Fraktionen mit geringerer Dichte, Fraktion eins und zwei, detektiert werden (Abb.5). Da Fyn bereits in unterschiedlichen Geweben und Spezies in lipid rafts detektiert werden konnte (Harder et al., 1998; Shenoy-Scaria et al., 1994; Wolven et al., 1997; Hering et al., 2003) und daher bereits vielfach als Marker für lipid rafts eingesetzt wurde, muss es sich bei den isolierten Fraktionen eins und zwei tatsächlich um mit lipid rafts angereicherte Fraktionen handeln. Konsistent damit konnte GAPDH, ein Schlüssel-Enzym der Glykolyse, welches nicht in der Membran sondern im Zytoplasma lokalisiert ist, ausschließlich in Fraktionen mit höherer Dichte, nicht-lipid raft Fraktionen (3 – 8), detektiert werden (Abb.5). Diese Resultate weisen somit darauf hin, dass die Dichtegradientenzentrifugation und somit die Isolierung von lipid rafts aufgrund der richtigen Verteilung des lipid raft Markers Fyn sowie des nicht-lipid raft Markers GAPDH erfolgreich war.

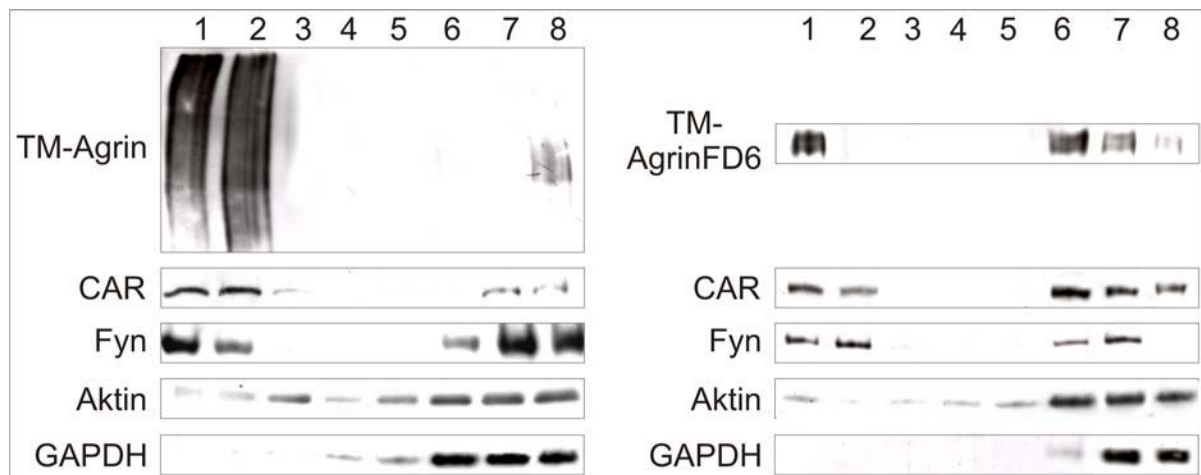


Abb.5: Proteinverteilung in transient transfizierten HEK 293 Zellen. HEK 293 Zellen wurden zunächst mit Vollängen TM-Agrin oder TM-AgrinFD6 cDNA transient transfiziert. Nach 24 Std. wurden bei 4° C Proteinlysate von den transfizierten Zellen hergestellt und über Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Danach wurden acht Fraktionen gleichen Volumens von oben nach unten (Fraktion 1-8) abgenommen. Alle Fraktion wurde per Western Blot mit den in der Abbildung angegebenen Ak und den entsprechenden Spezies spezifischen HRP-gekoppelten Zweitantikörpern analysiert. Fyn, CAR u. Vollängen TM-Agrin sowie TM-AgrinFD6 sind stark in Fraktion eins und zwei angereichert, Aktin jedoch nur schwach. Dahingegen kann GAPDH ausschließlich in Fraktion vier bis acht detektiert werden. Gezeigt sind representative Western Blots von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Resultaten.

Aktin konnte sowohl in lipid rafts (Fraktion 1 und 2) als auch in nicht-lipid rafts (Fraktion 3 – 8) detektiert werden. Das Transmembranprotein CAR fand sich in etwa gleicher Konzentration in lipid raft Fraktionen und nicht-lipid raft Fraktionen (Abb.5). TM-Agrin ist ein Heparansulfat Proteoglykan, das sich aufgrund seiner starken Glykosylierung im Western Blot als eine breite Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 600 kDa nachweisen lässt (Neumann et al., 2001). In transfizierten HEK 293 Zellen konnte Vollängen TM-Agrin, mittels Western Blot als eine breite Bande bei ca. 600 kDa in lipid rafts detektiert werden. Das verkürzte TM-Agrin Protein, TM-AgrinFD6, konnte ebenso mit dem anti-TM-Agrin Ak sowohl in Fraktionen nicht-lipid rafts als auch in lipid rafts detektiert werden (Abb.5).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass GAPDH in nicht-lipid raft Fraktionen, Aktin nur schwach und Fyn sowie CAR stark in lipid raft Fraktionen angereichert sind. Sowohl Vollängen TM-Agrin, dass die Bildung Aktin-haltiger Ausläufer induzieren kann (vgl. Abb.3 C-C'', D, E) aber auch TM-AgrinFD6, welches nicht mehr zur Bildung von Ausläufern in der Lage ist (Abb.14, D; Porten et al., Manuskript in Vorbereitung), konnten hauptsächlich in lipid raft Fraktionen nach Überexpression in HEK 293 detektiert werden. Die starke Anreicherung von TM-Agrin in lipid rafts lässt die Vermutung zu, dass diese, als Signalplattform fungierenden Regionen innerhalb der Zellmembran notwendig für die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer sind. Die in Bezug auf die Ausläuferbildung inaktive Variante von TM-Agrin, TM-AgrinFD6, wird ebenfalls in lipid rafts angereichert. Es ist jedoch möglich, dass durch die Deletion des gesamten C-Terminus eine Interaktion mit weiteren in lipid rafts befindlichen, signalweiterleitenden Proteinen gestört ist.

Um zu untersuchen ob TM-Agrin auch in neuronalen Zellen in lipid rafts detektiert werden kann und ob TM-Agrin sich schon vor oder erst nach der Aggregation durch Ak in lipid rafts anreichert, wurden lipid rafts aus RGC biochemisch aufgereinigt. Die Bildung Filopodien-ähnlicher Ausläufer in RGC beginnt bereits wenige Minuten nach der Zugabe von Ak und erreicht ein Maximum von ca. 40 Ausläufern pro 110 µm Axonsegment nach drei Stunden (Annie et al., 2006). Aus diesem Grund wurden RGC entweder gar nicht, für fünf Minuten oder für drei Stunden mit anti-Agrin Ak vorinkubiert. Die Solubilisierung, Dichtegradientenzentrifugation und anschließende Western Blot Analyse erfolgte analog zu den Verfahren, welche auch bei den transfizierten HEK 293 Zellen angewendet wurden. Der lipid raft Marker Fyn und das Transmembranprotein CAR konnten, analog zu den Ergebnissen die zuvor bei der Untersuchung der HEK 293 Zellen erhalten wurden, in lipid rafts, isoliert aus RGC, detektiert werden (Abb.6, Fraktion 1 und 2). Der Transferrin-Rezeptor (TfR), ein nicht-Tyrosinkinase Rezeptor, wird in vielen, verschiedenen Zelltypen exprimiert

und assoziiert erwiesenermaßen nicht mit lipid rafts (Janes et al., 1999; Pralle et al., 2000). Deshalb wurde als zusätzliche Kontrolle, um sicherzustellen, dass es sich bei Fraktion eins und zwei tatsächlich um lipid raft Fraktionen handelt, Western Blots unbehandelter und mit Ak behandelter RGC Fraktionen mit einem anti-TfR Ak inkubiert. TfR konnte lediglich in nicht-lipid raft Fraktionen (3 – 8) detektiert werden (Abb.6, Fraktion 3 – 8). Aktin reichte sich nur in geringen Konzentrationen in den lipid rafts der unbehandelten RGC an, wohingegen sich nach fünfminütiger als auch dreistündiger (nicht gezeigt) Ak Vorinkubation wesentlich mehr Aktin in den lipid raft Fraktionen anreicherte (Abb.6). GAPDH konnte sowohl in unbehandelten als auch in RGC, die über verschiedene Zeiträume mit Ak vorinkubiert wurden, analog zu den HEK 293 Zellen, ausschließlich in den nicht-lipid raft Fraktionen gefunden werden (Abb.6). Endogenes TM-Agrin konnte sowohl in unbehandelten als auch in RGC, die fünf Minuten bzw. drei Stunden (nicht gezeigt) mit Ak vorinkubiert wurden in lipid raft- (Fraktion 1 und 2) und nicht-lipid raft Fraktionen (Fraktion 3 - 8) detektiert werden (Abb.6)

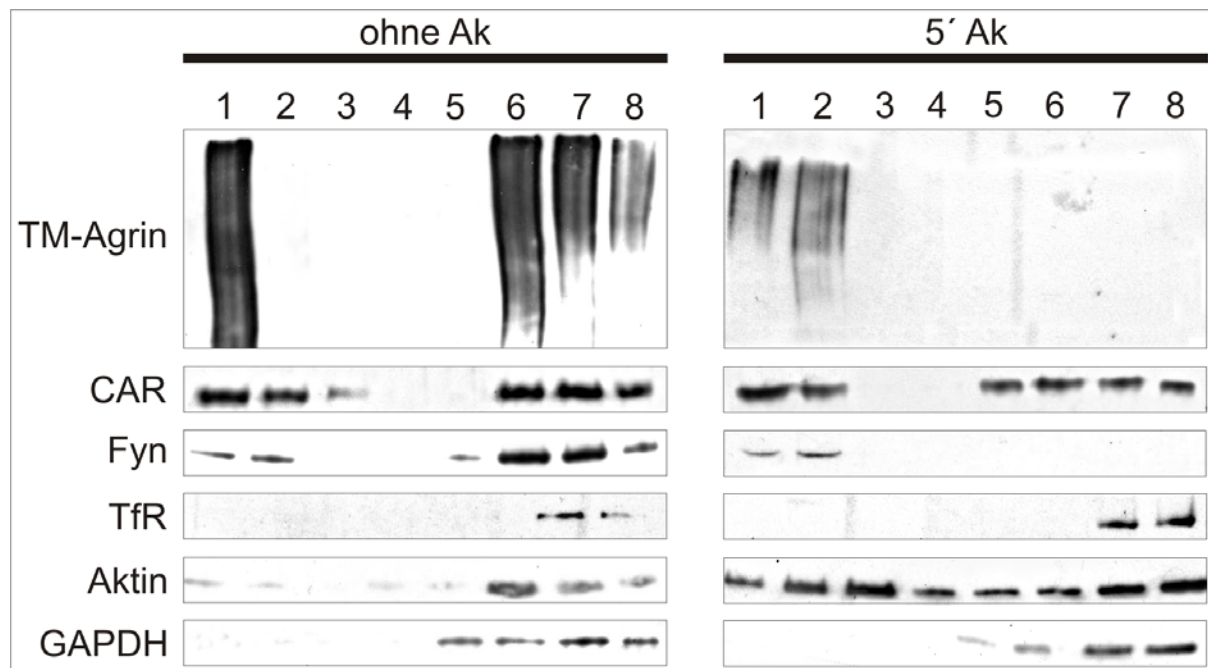


Abb.6: Proteinverteilung in unbehandelten und anti-Agrin Ak behandelten RGC. RGC wurden entweder unbehandelt oder nach fünfminütiger Inkubation mit anti-Agrin Ak in Kultur mit Triton X-100 bei 4° C lysiert. Danach wurden die Proteinlysate mittels Sucrosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Acht Fraktionen gleichen Volumens wurden von oben nach unten (Fraktion 1 - 8) abgenommen und per Western Blot mit den in der Abbildung angegebenen Ak analysiert. Analog zu den mit TM-Agrin cDNA Konstrukten transfizierten HEK 293 Zellen konnte Fyn und CAR sowohl in unbehandelten als auch in anti-Agrin Ak behandelten Zellen sowohl in lipid raft (1 + 2) als auch in Nicht-lipid raft Fraktionen (3 - 8) detektiert werden. GAPDH und TfR waren allein in den Fraktionen 3 - 8 angereichert. Aktin konnte in unbehandelten RGC sowie in mit anti-Agrin Ak behandelten RGCs in lipid raft und in Nicht-lipid raft Fraktionen nachgewiesen werden. Nach fünfminütiger und dreistündiger (nicht gezeigt) Ak Behandlung der RGC konnte mehr Aktin in lipid rafts detektiert werden als in unbehandelten RGC. TM-Agrin konnte, übereinstimmend mit den Ergebnissen die bei den nicht-neuronalen Zellen erhalten wurden, in lipid rafts und Nicht-lipid rafts gefunden werden. Diese Ergebnisse sind jedoch unabhängig davon, ob mit oder ohne anti-Agrin Ak inkubiert wurde. Gezeigt sind representative Western Blots von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Resultaten.

Die Analyse der RGC zeigte, dass TM-Agrin auch in neuronalen Zellen des ZNS zu einem großen Teil in lipid rafts angereichert ist. Weiterhin bleibt festzuhalten, dass TM-Agrin bereits vor der Aggregation und somit Aktivierung durch polyklonale Ak in lipid rafts lokalisiert war. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Transmembranproteine durch Aggregation mit Antikörpern vermehrt in lipid rafts verschoben werden, wodurch schlussendlich Signalkaskaden aufgrund räumlicher Nähe zu vielen signaltransduzierenden Molekülen in Gang gesetzt werden (Marta et al., 2003; Simons und Toomre, 2000). Die Resultate weisen jedoch darauf hin, dass TM-Agrin nicht erst durch Aggregation mit Ak in lipid rafts verschoben wird, sondern zu einem gewissen Prozentsatz dauerhaft in lipid rafts angereichert zu sein scheint.

5.2.2 TM-Agrin ist in lipid rafts neuronaler Zellen lokalisiert

Um festzustellen, ob lipid rafts auch in den durch TM-Agrin induzierten Filopodien-ähnlichen Ausläufern lokalisiert sind, wurden auswachsende Axone von RGC nach dreistündiger Inkubation mit dem anti-Agrin Ak fixiert und mit der fluoreszenzgekoppelten Cholera Toxin B Untereinheit (CTx) gefärbt (Abb.7, A). CTx bindet an Gangliosid GM1, einem Bestandteil der lipid rafts (Schon und Freire, 1989), und wurde bereits häufig in vielen unterschiedlichen Zellen und Geweben als lipid raft Marker verwendet (Bruses et al., 2001; Harder et al., 1998). Das in lipid rafts lokalisierte Gangliosid GM1 konnte sowohl entlang des gesamten Axonschafts als auch in den einzelnen durch TM-Agrin induzierten Ausläufern mittels einer CTx-Färbung nachgewiesen werden (Pfeile). Diese Resultate weisen darauf hin, dass lipid rafts nicht nur auf dem Axon, sondern auch in den lateralen Ausläufern lokalisiert sind.

Um weiterhin zu überprüfen ob TM-Agrin auch mit den auf RGC detektierten lipid rafts assoziiert, wurden RGC, wie zuvor erläutert, vorbehandelt und anschließend mit anti-Agrin Ak und fluoreszenzgekoppeltem CTx gefärbt. Sowohl auf dem Axon selbst, als auch in den Ausläufern, konnte eine partielle Kolo-kalisation von TM-Agrin und GM1 beobachtet werden. Dies ist, zusätzlich zu den Resultaten der biochemischen Untersuchung von lipid rafts, ein weiteres Indiz für die Assoziation von TM-Agrin mit lipid rafts. Die Ergebnisse weisen folglich auf eine mögliche Rolle von lipid rafts in der durch TM-Agrin induzierten Signalkaskade, welche in der Bildung von Ausläufern in nicht-neuronalen und neuronalen Zellen resultiert, hin.

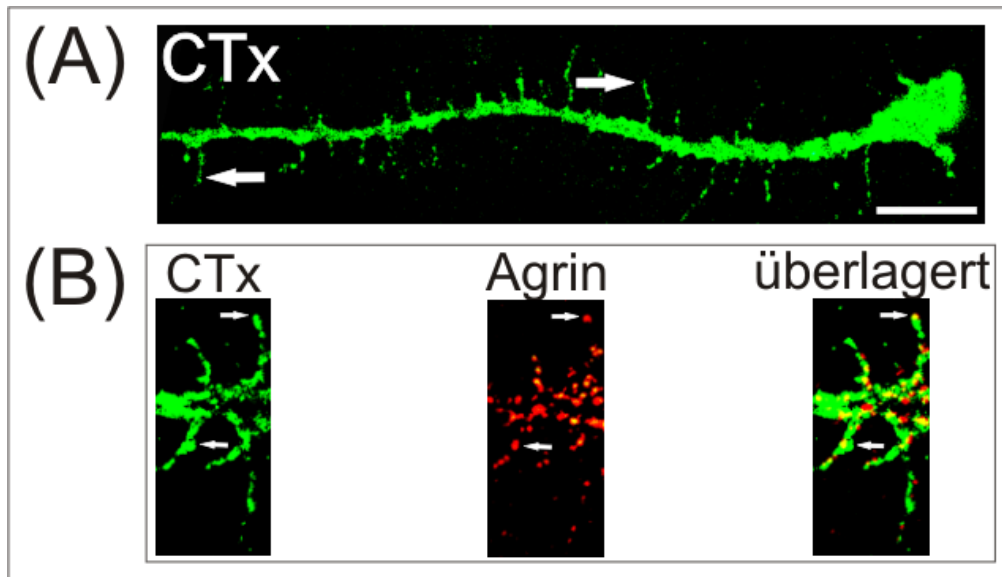


Abb.7: Verteilung von GM1 und TM-Agrin auf Axonen und Ausläufern von RGC. Auswachsende Axone retinaler Ganglienzellen wurden mit anti-Agrin Antikörpern 3 Std. lang zur Induktion von Ausläufern inkubiert. Die Zellen wurden mit FITC konjugiertem CTx (A, B; grün), welches an GM1 bindet, und anti-Agrin Ak (B; rot) gefärbt. GM1 bzw. lipid raft Bereiche befinden sich sowohl auf dem Axonschaft als auch in den TM-Agrin induzierten Ausläufern (A) Ferner kolokalisiert TM-Agrin zum Teil mit Lipid Rafts auf dem Axon und in den Ausläufern (B; Pfeile). (Skalierungsbalken= 10 μ m)

5.2.3 Lipid rafts sind notwendig für die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer

Falls lipid rafts notwendig für die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern sind, sollten sich nach deren Disintegration keine Ausläufer mehr ausbilden. Um diese Hypothese zu prüfen wurden auswachsende RGC mit methyl- β -Cyclodextrin (m β C) inkubiert. M β C ist ein wasserlösliches, zyklisches Oligomer, welches akut Cholesterol, einen Hauptbestandteil von lipid rafts, aus der Zellmembran entfernt, und dadurch lipid rafts zerstört (Ma et al., 2003; Simons und Toomre, 2000; Tansey et al., 2000). Um auszuschliessen, dass m β C generell die Morphologie auswachsender Axone beeinflusst, wurden RGC Axone unbehandelt kultiviert und parallel kultivierte RGC mit 2 mM m β C für insgesamt vier Stunden inkubiert. Im Vergleich zeigten unbehandelte und ausschliesslich mit m β C inkubierte RGC Axone keine morphologischen Unterschiede (nicht gezeigt). Für den eigentlichen Versuch wurden RGC Axone zunächst eine Stunde mit m β C in Kultur vorinkubiert und anschließend für weitere drei Stunden zusammen mit dem anti-Agrin Ak auf den RGC belassen. In Gegenwart von m β C (Abb.8, B; 1 und 2 mM) bildeten sich signifikant weniger Ausläufer als in ausschliesslich mit anti-Agrin Ak behandelten RGC Axonen aus (Abb.8, B; +Ak). Der Einfluss von m β C scheint aufgrund seiner Konzentrationsabhängigkeit und dem üblich verwendeten Konzentrationsspektrum von m β C (Willmann et al., 2006; Zhu et al., 2006) nicht unspezifisch zu sein (Abb.8, B).

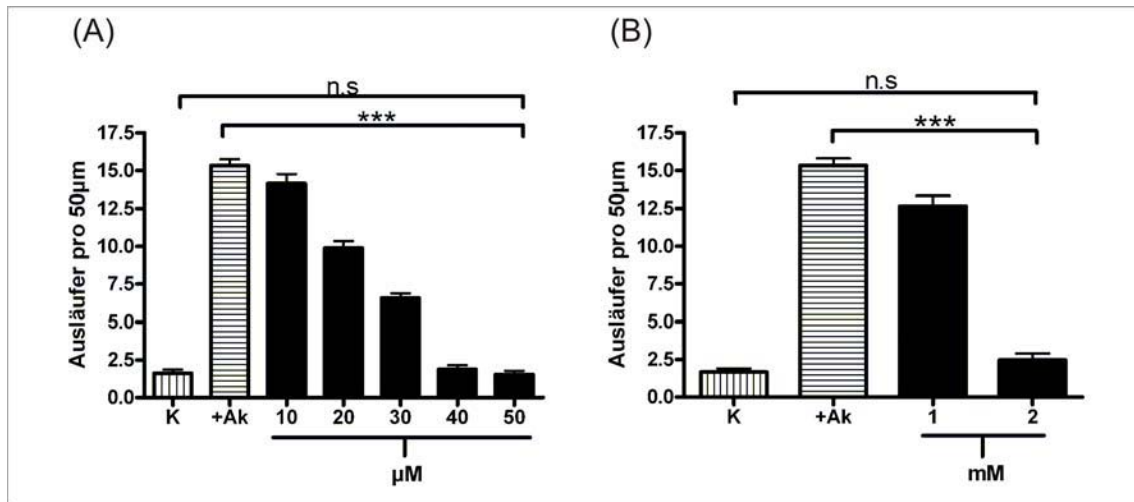


Abb.8: Quantitative Auswertung der Bildung von Ausläufern nach Behandlung mit lipid raft zerstörenden Agenzien. RGC Kulturen wurden entweder unbehandelt (K), 3 Std. mit anti-Agrin Ak (+Ak) oder mit den angegebenen Konzentrationen an PDMP (A) für 24 Std. bzw. mβC (B) für 1 Std. vorinkubiert, anschließend zusammen mit dem anti-Agrin Ak für weitere 3 Std. inkubiert und danach in Bezug auf die Bildung von Ausläufern analysiert. Unbehandelte Kulturen bilden im Mittel nur 1 - 2, anti-Agrin Ak behandelte Kulturen hingegen viele (ca. 15) Ausläufer aus. Die mit PDMP und mβC behandelten RGCs zeigten konzentrationsabhängig eine deutliche Reduktion der Ausläuferbildung. Die Fehlerbalken entsprechen +/- SEM mit N=3. *** $p < 0,001$; n.s. $p > 0,05$; unpaired t -test.

Um sicherzustellen, dass lipid rafts notwendig für die Ausläuferbildung sind, wurde die Wirkung von threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) untersucht. PDMP inhibiert die Glycosphingolipid Synthese und verringert dadurch die Konzentration an Sphingolipiden, einem weiteren wichtigen Bestandteil von lipid rafts in der Zellmembran (Inokuchi et al., 1987; Nagafuku et al., 2003). Konsistent mit den Ergebnissen, die bei der Behandlung mit mβC erzielt wurden, führte die Vorinkubation mit PDMP für 24 Stunden und anschließend drei Stunden zusammen mit dem anti-Agrin Ak zu einer starken Reduktion von Ausläufern (Abb.8, A).

TM-Agrin konnte biochemisch in lipid rafts nachgewiesen werden und kolokalisiert mit lipid rafts auf neuronalen Zellen. Zudem verhindert eine akute Disintegration von lipid rafts, als auch eine gestörte Biosynthese von charakteristischen lipid raft Komponenten, die Bildung von Ausläufern in Neuronen. Diese Resultate weisen darauf hin, dass lipid rafts eine wichtige Rolle bei der TM-Agrin induzierten Bildung von Ausläufern in Neuronen spielen.

Um zu untersuchen ob lipid rafts nicht nur für die Bildung von Ausläufern, sondern auch für deren Stabilität erforderlich sind, wurden zunächst Ausläufer durch anti-Agrin Ak Zugabe auf RGC Axonen induziert. Anschließend wurden die Kulturen gewaschen, um den anti-Agrin Ak zu entfernen, und danach für weitere eineinhalb Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von mβC inkubiert. Um auszuschließen, dass RGC Ausläufer lediglich in Gegenwart von anti-Agrin Ak stabil bleiben, wurden parallel kultivierte RGC Axone nach dreistündiger anti-Agrin Ak Inkubation gewaschen, danach aber für weitere eineinhalb

Stunden ohne mβC Zugabe kultiviert. In Abbildung neun ist die statistische Auswertung des Versuches dargestellt.

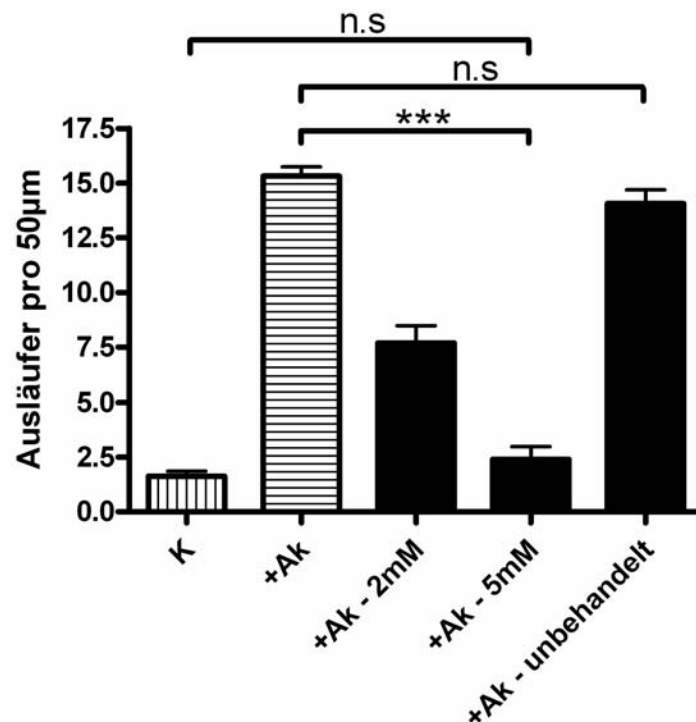


Abb.9: Quantitative Auswertung des Einflusses von mβC auf die Stabilität bereits gebildeter Ausläufer. RGC Kulturen wurden entweder unbehandelt (K), 3 Std. mit anti-Agrin Ak (+Ak), 3 Std. mit anti-Agrin Ak und anschließend 1,5 Std. mit mβC (+Ak – 2mM und +Ak – 5mM) oder 3 Std mit anti-Agrin Ak und anschließend 1,5 Std. ausschließlich in Medium (+Ak – unbehandelt) kultiviert. Die Behandlung mit mβC führt zu einer Reduktion bereits gebildeter Ausläufer. Wohingegen Kulturen die nach anti-Agrin Ak Inkubation für 1,5 Std. lediglich in Medium weiter kultiviert wurden, keine Reduktion in der Anzahl bereits gebildeter Ausläufer zeigten. Die Fehlerbalken entsprechen +/- SEM mit N=3. *** $p < 0,001$; n.s. $p > 0,05$; unpaired t -test.

Die Ergebnisse zeigen, dass bereits durch anti-Agrin Ak bzw. TM-Agrin induzierte Ausläufer sich aufgrund anschließender Behandlung mit mβC zurückbilden (Abb.9, +Ak – 2mM und +Ak – 5mM). RGC die nach anti-Agrin Ak Behandlung nicht mit mβC behandelt wurden, sondern in Kulturmedium weiter wuchsen (Abb.9, +Ak – unbehandelt), bildeten ihre Ausläufer, im Vergleich zu RGC, die bereits nach drei Stunden ausgewertet wurden, nicht zurück (Abb.9, +Ak; siehe auch Annies et al. 2006).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass lipid rafts nicht nur für die TM-Agrin induzierte Bildung von Filopodien-ähnlichen Ausläufern, sondern auch für deren Aufrechterhaltung notwendig sind.

5.3 Die Aktivierung von TM-Agrin induziert die Phosphorylierung an Tyrosinresten bestimmter Proteine

In vielen Systemen folgt auf die Liganden oder Ak vermittelte Aktivierung von Molekülen in lipid rafts eine Initiierung von spezifischen Signalkaskaden (Simons und Toomre, 2000). Fast alle Signalkaskaden verlaufen dabei zumindest am Anfang über die Phosphorylierung von Tyrosinresten in signalweiterleitenden Molekülen, die mit lipid rafts assoziiert sind.

Um aufzuklären, ob TM-Agrin nach Aktivierung durch anti-Agrin Ak die Phosphorylierung von signalweiterleitenden Molekülen in lipid rafts induziert, wurden RGC mit anti-Agrin Ak inkubiert, lysiert und mittels Western Blot analysiert. Um sicher zu gehen, dass die gleichen Mengen an Protein pro Lane aufgetragen wurden, wurde Aktin als Ladekontrolle verwendet.

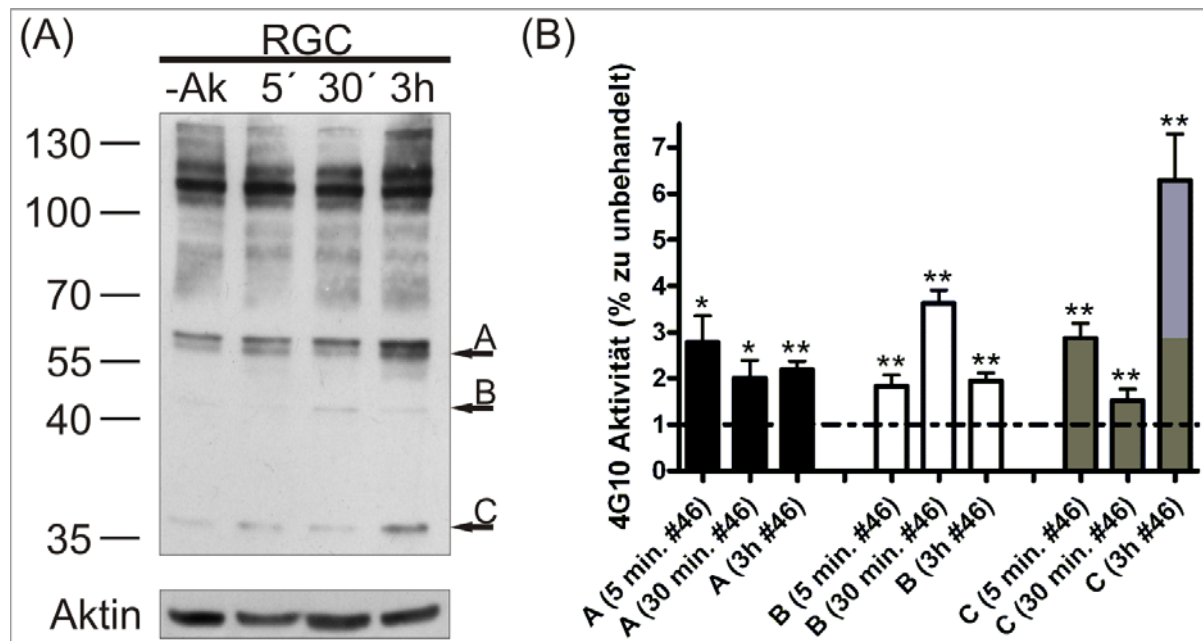


Abb.10: Untersuchung Tyrosinphosphorylierter Proteine nach TM-Agrin „Aktivierung“. (A) RGC Zelllysate unbehandelter (-Ak), und mit anti-Agrin Ak inkubierter RGC (5' = 5 min; 30' = 30 min.; 3h = 3 Std.) wurden per Western Blot mit dem anti-Phosphotyrosin-spezifischen 4G10 Ak analysiert. Die Tyrosinphosphorylierung von drei Proteinen wurde zeitabhängig hochreguliert (siehe Pfeile A, B, C). Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Resultaten. (B) Die densitometrische Auswertung der hochregulierten Proteine (vgl. Pfeile A, B, C in Abb. 11, A) ergab, dass sie nach 5 min. (A), 30 min. (B) und 3 h (C) maximal Tyrosinphosphoryliert waren. Die Auswertung wird dargestellt als prozentuale Erhöhung zu unbehandelten RGC (Abb.11, A: -Ak; B: gestrichelte Linie bei eins auf der Y-Achse) nach Normalisierung der relativen Bandenschwärzung des 4G10 Signals zum Aktin Signal. Die Fehlerbalken entsprechen +/- SEM mit N=3. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; one-sample t -test.

Tyrosinphosphorylierte Proteine wurden mit dem anti-Phosphotyrosin Ak 4G10 detektiert (Abb.10, A). Zeitabhängig konnte die Hochregulierung der Tyrosinphosphorylierung von drei Banden bei ca. 60 kDa (Abb.10, A; A), ca. 45 kDa (Abb.10, A; B) und ca. 36 kDa (Abb.10, A; C) beobachtet werden. Die Bande bei ca. 60 kDa (A in Abb.10, A und B) war bereits nach

fünf Minuten anti-Agrin Ak Zugabe am stärksten phosphoryliert, die Bande bei ca. 45 kDa (B in Abb.10, A und B) nach dreißig Minuten und die Bande bei ca. 36 kDa (C in Abb.10, A und B) erst nach drei Stunden. Aus den erhaltenen Resultaten lässt sich demzufolge schliessen, dass ein initialer Schritt der durch TM-Agrin induzierten Signalkaskade die Tyrosin-Phosphorylierung weniger Proteine zu sein scheint. Die Untersuchung der Phosphorylierungskinetik dieser Proteine zeigt zudem, dass die Proteine unterschiedlich schnell nach Antikörperzugabe phosphoryliert werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass weitere an Tyrosinresten phosphorylierte Proteine unter der verwendeten Detektionsgrenze liegen, oder TM-Agrin abhängig Proteine an Serin/Threonin phosphoryliert werden.

Als nächstes wurde untersucht, ob Tyrosinphosphorylierte Proteine mit aggregiertem TM-Agrin kovertelt sind. Dazu wurde zunächst die Bildung von Ausläufern durch anti-Agrin Ak Zugabe induziert. Danach wurden die RGC fixiert und mit dem anti-Agrin Ak und dem 4G10 Ak inkubiert. Die Färbung erfolgte mit den Spezies-spezifischen Farbstoff-konjugierten Zweitantikörpern. An Tyrosinresten phosphorylierte Proteine (dargestellt in grün) finden sich sowohl auf dem Axonschaft als auch in den TM-Agrin induzierten Ausläufern (Abb.11). Ebenso auf dem Axonschaft als auch in den Ausläufern kann eine starke Agrin Färbung (Abb.11, dargestellt in rot) detektiert werden. Überlagert man beide Färbungen fällt auf, dass TM-Agrin und die an Tyrosinresten phosphorylierten Proteine auf dem Axonschaft, dort besonders an den Ansatzpunkten lateraler Ausläufer, und in den Ausläufern selbst (weiße Pfeile in Abb.11), kovertelt sind. Anhand von Kofärbungen konnte somit eine Kovertelung von aggregiertem TM-Agrin und an Tyrosinresten phosphorylierten Proteinen auf dem Axonschaft und den Ausläufern von Neuronen gezeigt werden

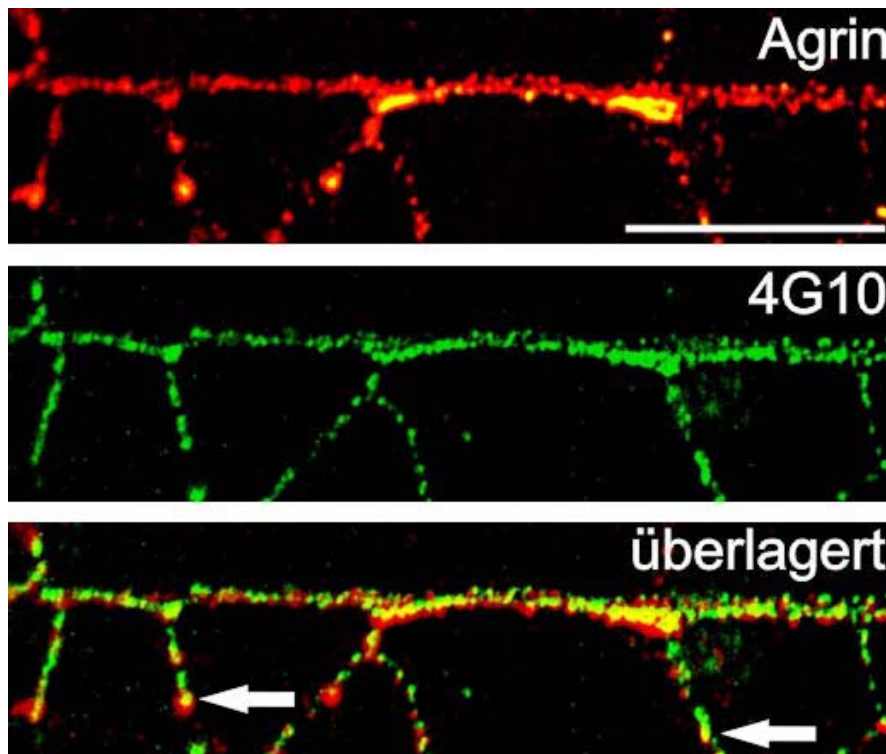


Abb.11: Verteilung Tyrosinphosphorylierter Proteine auf RGC. RGC wurden für 3 Std. mit dem anti-Agrin Ak zur Bildung von Ausläufern inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 4% PFA fixiert, unspezifische Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit PBS/10% FCS abgesättigt und danach über Nacht mit dem anti-Agrin und dem 4G10 Ak inkubiert. TM-Agrin und Tyrosinphosphorylierte Proteine sind sowohl auf dem Axonschaft als auch auf den Ausläufern (Pfeile) zumindest teilweise kovertelt. (Skalierungsbalken = 10µm)

5.4 Fyn ist notwendig für die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern

5.4.1 TM-Agrin induziert die Phosphorylierung von Fyn in neuronalen Zellen

Bei der Untersuchung von Proteinen, die an Tyrosinresten phosphoryliert werden zeigte sich, dass im Bereich von ca. 60 kDa die Phosphorylierung eines bestimmten Proteins TM-Agrin abhängig hochreguliert wurde (Abb. 10). Ein potentieller Kandidat für diese Bande ist Fyn. Fyn ist ein 59 kDa großes Mitglied der Src-Kinase Familie (Brown und Cooper, 1996) das ubiquitär exprimiert wird (Thomas und Brugge, 1997) und wie alle Src-Familie Kinasen durch Phosphorylierung eines Tyrosinrestes in der C-terminalen SH1-Domäne aktiviert wird (Resh, 1998). Ferner konnte in vorherigen Untersuchungen bereits gezeigt werden, dass Fyn zusammen mit TM-Agrin in nicht-neuronalen und neuronalen Zellen in lipid raft Fraktionen angereichert ist (Abb. 5 und 6).

Um herauszufinden ob die Bande bei ca. 60 kDa phosphoryliertes Fyn darstellt, wurden RGC mit anti-Agrin Ak über verschiedene Zeiträume inkubiert (Abb.12, A), lysiert und mittels Western Blot analysiert. Phosphoryliertes Fyn wurde mit dem phospho-Src-

Kinase Familie spezifischen Ak pY⁴¹⁸ detektiert. Um sicher zu stellen, dass lediglich die Phosphorylierung von Fyn und nicht die Expression von Fyn hochreguliert wurde, wurden Western Blots zudem mit einem Fyn spezifischen Ak FYN3 (hier in Abb.12, Fyn), der sowohl an unphosphoryliertes als auch phosphoryliertes Fyn bindet (Kovacic et al., 1998; Li et al., 2005), untersucht. Der anti-Agrin Ak, welcher zur Aktivierung von TM-Agrin und somit zur Induktion der Ausläufer Bildung verwendet wird, wurde aus dem Serum immunisierter Kaninchen über Protein A Säulen Affinätsgereinigt. Aus diesem Grund ist der anti-Agrin Ak geringfügig mit anderen IgGs aus Kaninchen verunreinigt. Um sicherzustellen, dass der anti-Agrin Ak und nicht die übrigen IgGs aus dem Kaninchen die Phosphorylierung von Fyn über andere Mechanismen verursachen, wurden parallel kultivierte RGC mit IgGs isoliert aus Präimmunserum für fünf Minuten inkubiert, lysiert und ebenfalls mittels Western Blot mit den oben erwähnten Ak analysiert (Abb.12, A; Prä).

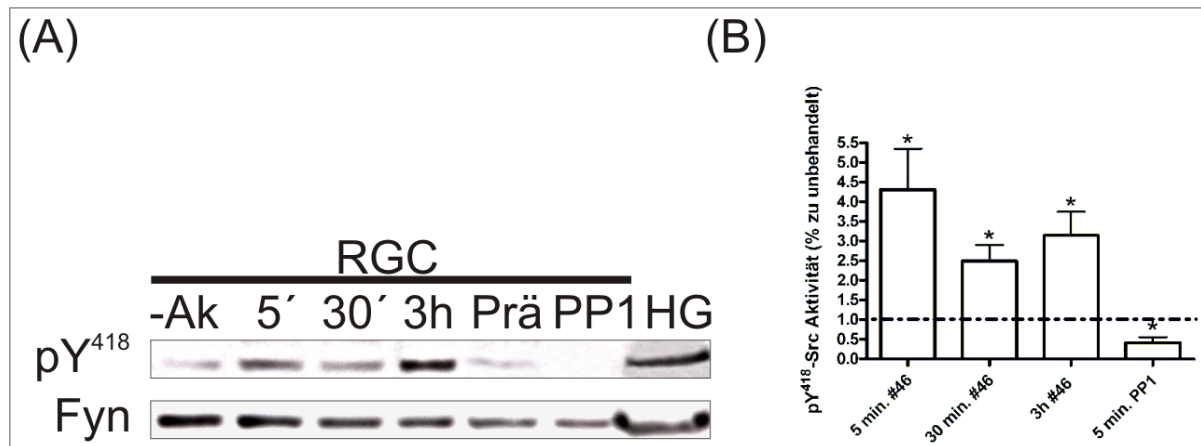


Abb.12: Analyse der Phosphorylierung von Fyn in RGC und Gesamthirn. (A), RGC Zelllysate unbehandelter (-Ak), mit anti-Agrin Ak behandelte (5', 30', 3 Std.), mit Präimmun-IgG für 5 min. behandelte (Prä) und mit PP1 behandelte Zellen (1 Std. Vorinkubation danach 5 min. zusammen mit anti-Agrin Ak) wurden mittels Western Blot mit dem pY⁴¹⁸ Ak und dem Fyn Ak analysiert. Die Fyn Phosphorylierung wurde bereits nach 5 min. hochreguliert. Präimmun-IgGs waren nicht in der Lage die Phosphorylierung von Fyn zu erhöhen. Die Inkubation mit PP1 führte zur Reduktion der Fyn Phosphorylierung. Im Lysat aus Huhn Gesamtgehirn (E7) ist Fyn ebenfalls phosphoryliert. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Resultaten. (B) Die densitometrische Auswertung der Regulierung von Fyn ergab, dass Fyn schon nach 5 min. am stärksten phosphoryliert war. Die Behandlung mit PP1 führte zu einer Reduktion der Phosphorylierung von Fyn bis unter den Level unbehandelter RGC. Die Auswertung wird dargestellt als prozentuale Erhöhung zu unbehandelten RGC (Abb.12, A: -Ak; B: gestrichelte Linie bei eins auf der Y-Achse) nach Normalisierung der relativen Bandenschwärzung des pY⁴¹⁸ Signals zum Fyn Signal. Die Fehlerbalken entsprechen +/- SEM mit N=3. * $p < 0,05$; one-sample t -test.

In Abbildung 12A ist zu erkennen, dass bereits nach fünfminütiger anti-Agrin Ak Inkubation die Phosphorylierung von Fyn im Vergleich zu unbehandelten (-Ak) und mit Präimmun-IgG behandelten RGC (Prä) um etwa das vierfache zugenommen hat. Eine erhöhte Fyn Phosphorylierung konnte auch noch nach dreißigminütiger sowie auch dreistündiger anti-Agrin Ak Zugabe beobachtet werden. Ausserdem findet sich eine stark phosphorylierte Fyn Bande im Lysat aus E7 Huhn Gesamtgehirn (HG). Nicht sicher ist allerdings, ob die *in vivo*

detektierte Phosphorylierung durch TM-Agrin induziert wurde, noch ob das phosphorylierte Fyn aus neuronalen oder nicht-neuronalen Zellen stammt. Die densitometrische Auswertung mehrerer Western Blots (Abb.12, B) ergab, dass Fyn bereits nach fünfminütiger Inkubation mit dem anti-Agrin Ak im Vergleich zu unbehandelten RGC (Abb.12, B; gestrichelte Linie bei eins auf der Y-Achse) signifikant hochreguliert wurde. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation mit dem Src-Kinase Familie spezifischen Inhibitor PP1 (Hanke et al., 1996) zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung bis unter den Level unbehandelter RGC. Vergleicht man die Kinetiken der Phosphorylierung in Abbildung 10 B Bande A mit der Kinetik der Fyn Phosphorylierung stellt man fest, dass diese annähernd gleich sind. Die Ergebnisse lassen somit die Vermutung zu, dass die 60 kDa Bande A in Abbildung 10 Fyn ist, und dass Fyn TM-Agrin abhängig in RGC phosphoryliert wird.

5.4.2 Fyn wird TM-Agrin abhängig in nicht-neuronalen Zellen phosphoryliert

In den vorherigen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass TM-Agrin die Phosphorylierung von Fyn in neuronalen Zellen induzieren kann. Ferner induziert TM-Agrin die Bildung von Ausläufern in neuronalen Zellen aber auch in nicht-neuronalen Zellen. Falls ein Zusammenhang zwischen der Fyn Phosphorylierung und der Ausläuferbildung bestehen sollte, dann müsste demzufolge TM-Agrin auch in nicht-neuronalen Zellen die Phosphorylierung von Fyn induzieren können.

Um zu überprüfen ob Fyn TM-Agrin abhängig in nicht-neuronalen Zellen phosphoryliert wird, wurde TM-Agrin transient in HEK 293 Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurden untransfizierte HEK 293, sowie mit dem Leervektor pEGFP-N1 transfizierte HEK 293 Zellen verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Phosphorylierung von Fyn mit dem pY⁴¹⁸ Ak auf Western Blots untersucht. Um auszuschliessen, dass TM-Agrin die Expression von Gesamt-Fyn (phosphoryliertes und unphosphoryliertes Protein) beeinflusst, wurden die Western Blots mit FYN3 (hier in Abb.13, A: Fyn) inkubiert. Die Transfektion von TM-Agrin in HEK 293, führte im Vergleich zu untransfizierten und mit dem Leervektor transfizierten Zellen, zur Hochregulation der Fyn Phosphorylierung um etwa das Dreifache (Abb.13, B). Die Menge an Gesamt Fyn blieb jedoch in den verschiedenen Versuchsansätzen nahezu unverändert. Infolgedessen scheint TM-Agrin nicht nur in neuronalen Zellen, sondern auch in nicht-neuronalen Zellen über die Phosphorylierung von Fyn die Bildung von Ausläufern zu induzieren. Obwohl das TM-Agrin Deletionskonstrukt TM-AgrinFD6 nicht in der Lage ist Ausläufer zu induzieren, hatten frühere Untersuchungen gezeigt, dass TM-AgrinFD6 dennoch in lipid rafts, die wiederum notwendig sind für die Bildung von Ausläufern, angereichert ist (siehe Abb.5).

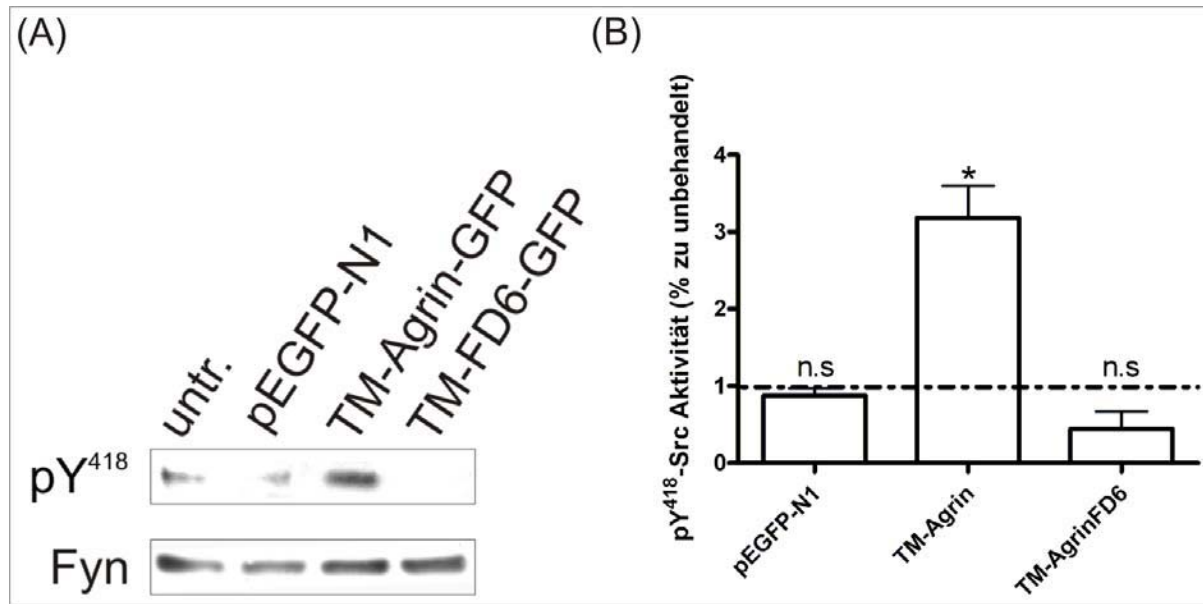


Abb.13: Phosphorylierung von Fyn in TM-Agrin überexprimierenden nicht-neuronalen Zellen. (A) HEK 293 Zellen wurden entweder nicht transfiziert (untr.) oder mit Vollängen TM-Agrin oder pEGFP-N1 Leervektor oder TM-AgrinFD6 cDNA transient transfiziert. Nach 24 Std. wurden Proteinlysate der transfizierten und untransfizierten Zellen hergestellt und durch Western Blots mit dem pY418 und dem FYN3 (hier Fyn) Ak analysiert. Die Überexpression von Vollängen TM-Agrin resultierte in der erhöhten Phosphorylierung von Fyn. (B) Die densitometrische Auswertung ergab, dass die Phosphorylierung von Fyn nach Überexpression von TM-Agrin um etwa das dreifache hoch reguliert wird. Sowohl die Überexpression des Leervektors pEGFP-N1, als auch des inaktiven TM-AgrinFD6 hatten einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Fyn. Die Auswertung wird dargestellt als prozentuale Erhöhung zu untransfizierten HEK 293 (Abb.13, A: untr.; B: gestrichelte Linie bei eins auf der Y-Achse) nach Normalisierung der relativen Bandenschwärzung des pY⁴¹⁸ Signals zum Fyn Signal. Die Fehlerbalken entsprechen $\pm$ SEM mit N=3. * $p < 0,05$; one-sample *t*-test.

Um zu analysieren ob TM-AgrinFD6 zudem noch in der Lage ist die Phosphorylierung von Fyn zu beeinflussen, wurde TM-AgrinFD6 in HEK 293 Zellen überexprimiert und die Phosphorylierung von Fyn mittels eines phosphospezifischen Ak analog zu den TM-Agrin überexprimierenden Zellen untersucht. TM-AgrinFD6 ist im Gegensatz zu Vollängen TM-Agrin allerdings nicht mehr dazu befähigt die Phosphorylierung von Fyn zu beeinflussen (Abb.13). Die in diesem Abschnitt erhaltenen Resultate zeigen folglich, dass TM-Agrin nicht nur in neuronalen sondern auch in nicht-neuronalen Zellen die Phosphorylierung von Fyn induzieren kann. Ferner ist TM-AgrinFD6 nicht in der Lage die Fyn Phosphorylierung zu beeinflussen. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass zum Einen die in TM-AgrinFD6 fehlenden Domänen für die Phosphorylierung von Fyn wichtig sind und zum Anderen, dass die Phosphorylierung von Fyn notwendig für die Bildung von Ausläufern ist.

5.4.3 Immunozytochemische Analyse der Phosphorylierung von Fyn in TM-Agrin überexprimierenden nicht-neuronalen Zellen

Um die Ergebnisse der vorherigen biochemischen Untersuchung von Fyn in nicht-neuronalen Zellen weiter zu untermauern, wurden TM-Agrin überexprimierende HEK 293 Zellen mit dem phosphospezifischen pY⁴¹⁸ Ak und einem anti-Fyn Ak immunozytochemisch analysiert (Abb.14, C). Um auszuschliessen, dass Fyn nicht ohnehin in HEK 293 Zellen stark phosphoryliert ist, oder dass der Transfektionsprozess die Phosphorylierung von Fyn beeinflusst, wurden unbehandelte HEK 293 Zellen (Abb.14, A) und pEGFP-N1 (Leervektor) überexprimierende HEK 293 Zellen (Abb.14, B) analog zu den TM-Agrin überexprimierenden Zellen untersucht. Ferner wurden TM-AgrinFD6 überexprimierende HEK 293 Zellen immunozytochemisch untersucht (Abb.14, D), da in den vorangehenden biochemischen Untersuchungen (siehe Abschnitt 5.4.2) gezeigt werden konnte, dass TM-AgrinFD6 im Gegensatz zu Volllängen TM-Agrin nicht mehr in der Lage ist die Phosphorylierung von Fyn zu induzieren. Damit unbehandelte HEK 293 Zellen (Abb.14, A) und mit cDNA transfizierten HEK 293 Zellen (Abb. 14, B, C und D) detektiert werden konnten, wurden unbehandelte HEK 293 Zellen mit fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin markiert und transfizierte Zellen mit anti-GFP Ak markiert. Weiterhin wurden alle Zellen mit dem pY⁴¹⁸ Ak (Suter und Forscher, 2001), dem FYN3 Ak (hier Fyn) und DAPI analysiert. Die Ergebnisse der immunozytochemischen Untersuchungen bestätigen die biochemischen Resultate. Ausschliesslich TM-Agrin war in der Lage die Phosphorylierung von Fyn zu beeinflussen, was an der ausgeprägteren pY⁴¹⁸ Färbung (C, pY⁴¹⁸), im Vergleich zu untransfizierten Zellen (A, pY⁴¹⁸) bzw. Leervektor (B, pY⁴¹⁸) oder TM-AgrinFD6 (D, pY⁴¹⁸) überexprimierenden Zellen, zu erkennen ist. Die Färbung von Gesamt-Fyn (phosphoryliert und unphosphoryliertes Protein) hingegen war in allen untersuchten Zellen in etwa gleich (Abb.14, A, B, C und D; Fyn). Das Resultat der immunozytochemischen Untersuchung, sowie die Ergebnisse, die bei den vorherigen biochemischen (siehe Abschnitt 5.4.2) Untersuchungen erhalten wurden, zeigen, dass TM-Agrin die Phosphorylierung von Fyn und nicht etwa die Expression von Gesamt-Fyn (unphosphoryliertes und phosphoryliertes Fyn) in auch in nicht-neuronalen Zellen beeinflusst. Phosphoryliertes Fyn konnte sowohl auf dem Zellkörper als auch in den Ausläufern TM-Agrin überexprimierender Zellen in punktierter Form nachgewiesen werden (Abb.14, C; vergrößerter Ausschnitt). Dies lässt die Hypothese zu, dass gerade in den Bereichen punktierter phospho-Fyn Färbung TM-Agrin durch Überexpression aggregiert ist und darauf folgend die Phosphorylierung von Fyn induziert hat.

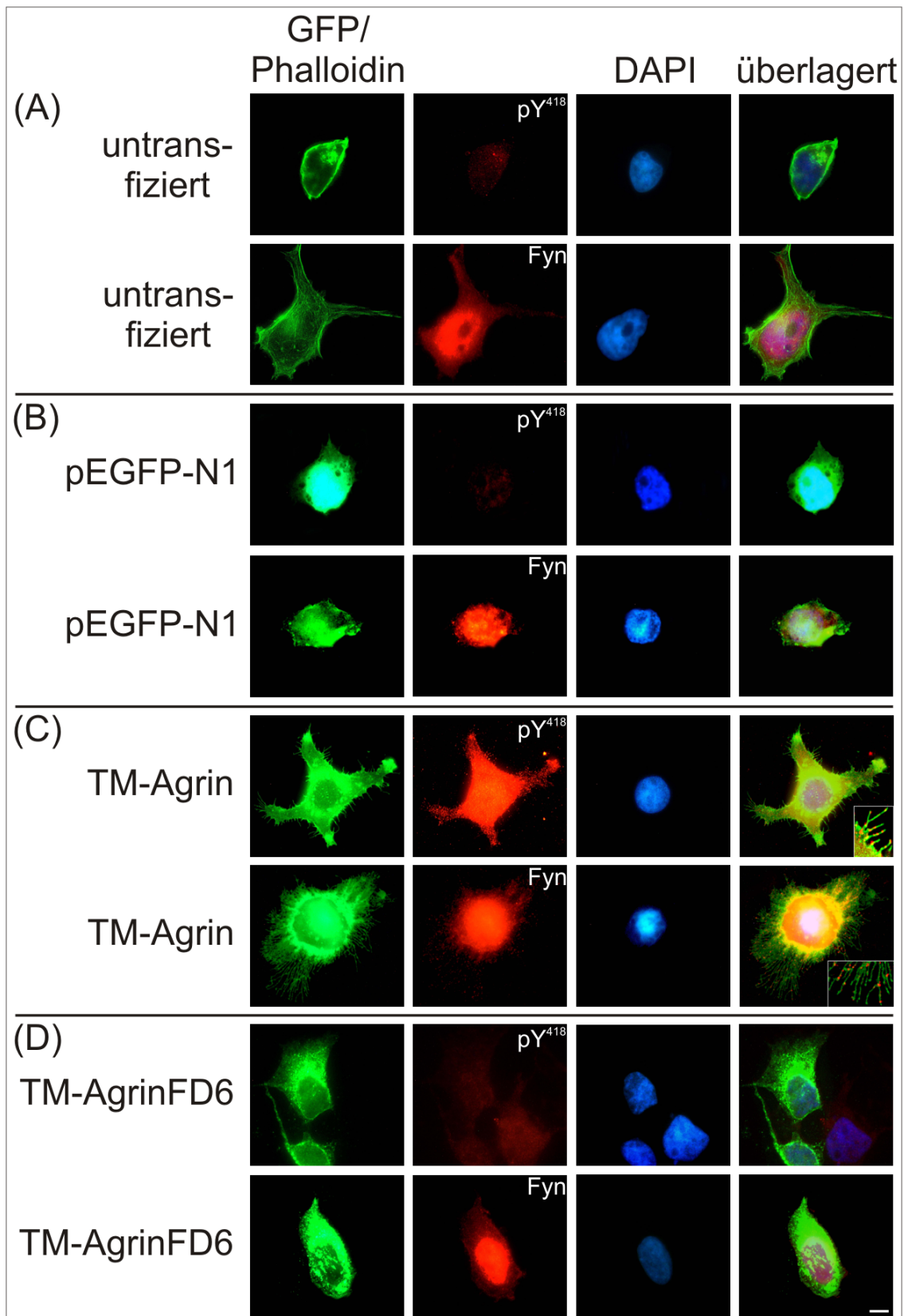


Abb.14: Immunozytochemische Untersuchung der Phosphorylierung von Fyn. HEK 293 Zellen wurden entweder nicht transfiziert (A) oder transient mit cDNA, die für TM-Agrin (C) oder TM-AgrinFD6 (D) oder den Leervektor pEGFP-N1(B) kodiert, transfiziert. Transfizierte Zellen wurden mit anti-GFP (B, C, D) und untransfizierte Zellen mit fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin gefärbt (A). Zudem wurden die Zellen mit dem pY⁴¹⁸ Ak oder dem anti-Fyn Ak und DAPI gefärbt. Die mit TM-Agrin cDNA transfizierten Zellen zeigen, im Gegensatz zu untransfizierten, mit Leervektor oder mit TM-AgrinFD6 cDNA transfizierten Zellen, eine stärkere pY⁴¹⁸ Färbung, wohingegen die Intensität der Färbung mit dem Fyn Ak annähernd gleich stark zu sein scheint. (Skalierungsbalken = 10µm)

Die TM-Agrin abhängige Bildung von Ausläufern und die Phosphorylierung von Fyn konnte in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen anhand von biochemischen und immunozytochemischen Untersuchungen nachgewiesen werden. Daher liegt die Vermutung nah, dass die TM-Agrin induzierte Ausläuferbildung von der vorherigen Fyn Phosphorylierung abhängig sind. Ein weiteres Indiz für diese Hypothese ist, dass sowohl TM-Agrin als auch Fyn in lipid rafts lokalisiert sind.

5.4.4 Die TM-Agrin abhängige Phosphorylierung von Fyn ist notwendig für die Ausläuferbildung

Falls Fyn also notwendig für die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern ist, und nicht in einem anderen Kontext TM-Agrin abhängig phosphoryliert wird, sollte die Inhibierung der Fyn-Kinase Aktivität eine reduzierte Ausläuferbildung zur Folge haben. Um dies zu überprüfen wurden auswachsende RGC mit dem selektiven Src-Kinase Familie Inhibitor PP1 (Bouillon et al., 2003; Hanke et al., 1996) in unterschiedlichen Konzentrationen für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit dem anti-Agrin Ak zusammen für weitere drei Stunden behandelt. In Voruntersuchungen an RGC, die nicht mit anti-Agrin Ak inkubiert wurden, konnte sichergestellt werden, dass weder PP1 noch das zur Lösung von PP1 verwendete DMSO die Morphologie der untersuchten RGC im Vergleich zu parallel kultivierten, unbehandelten RGC beeinflusst. Bei Zellen, die jedoch mit anti-Agrin Ak inkubiert wurden um die Bildung von Ausläufern zu induzieren, führte die Inkubation mit PP1 konzentrationsabhängig zu einer starken Reduktion der von TM-Agrin abhängigen Ausläuferbildung (Abb.15) bis hin zum Level unbehandelter RGC. Dies weist darauf hin, dass Fyn eine entscheidende signalweiterleitende Funktion in der durch TM-Agrin vermittelten Bildung von Ausläufern übernimmt.

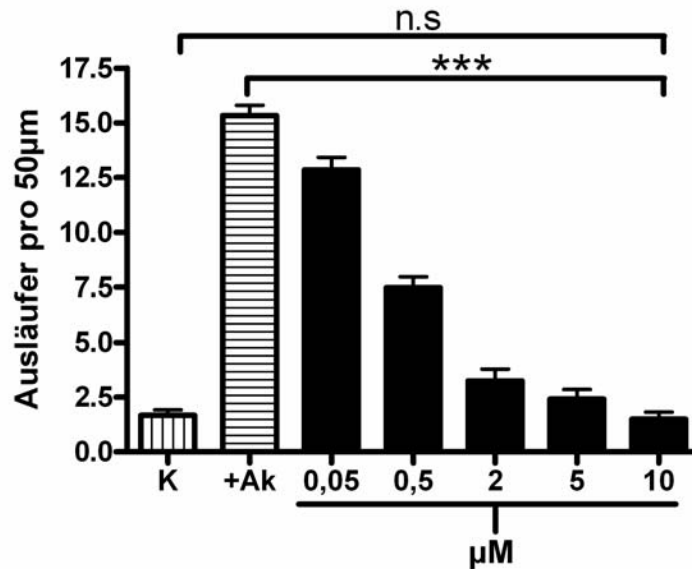


Abb.15 Analyse der Bildung von Ausläufern nach Behandlung mit dem Src-Kinase Familie spezifischen Inhibitor PP1. RGC Kulturen wurden entweder unbehandelt (K), 3 Std. mit anti-Agrin Ak (+Ak) oder mit den angegebenen Konzentrationen an PP1 (0,05µM – 10µM) für 1 Std. vorinkubiert und anschließend zusammen mit dem anti-Agrin Ak für weitere 3 Std. inkubiert. Es ist Konzentrationsabhängig eine starke Reduktion der Bildung von Ausläufern zu erkennen. Die Quantitative Auswertung der Behandlung von RGC mit PP1 unterstützt diese Beobachtungen. Die Fehlerbalken entsprechen +/- SEM mit N=3. *** $p < 0,001$; n.s. $p > 0,05$; unpaired t -test.

5.5 Die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern ist abhängig von der Mitogen aktivierten Protein Kinase

In Abschnitt 5.3 (Abb.10) wurden insgesamt drei an Tyrosinresten phosphorylierte Banden detektiert, die TM-Agrin abhängig hoch reguliert wurden. Im vorherigen Abschnitt konnte bereits durch biochemische, immunozytochemische und pharmakologische Untersuchungen sowohl an neuronalen und nicht-neuronalen Zellen gezeigt werden, dass Fyn eine dieser Banden darstellt. Die beiden anderen Banden im Tyrosinphosphat Blot waren aber noch unbekannt. Eines der drei hoch regulierten Tyrosinphosphorylierten Banden konnte bei ca. 45 kDa detektiert werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die 44 und 42 kDa große Mitogen aktivierte Protein (MAP) Kinase eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung in unterschiedlichen Zelltypen spielt (Cowley et al., 1994; Hill und Treisman, 1995; Hunter, 1995; Marshall und Leever, 1995), und genauso wie Fyn an Tyrosinresten phosphoryliert wird, lag nahe, eine Regulierung der MAPK durch TM-Agrin zu untersuchen.

5.5.1 TM-Agrin induziert die Phosphorylierung der Mitogen aktivierten Protein Kinase

Um aufzuklären, ob die Phosphorylierung der 44/42 MAPK TM-Agrin abhängig hochreguliert wird, wurden RGC über verschiedene Zeiträume mit anti-Agrin Ak inkubiert, lysiert und mittels Western Blot analysiert. Phosphorylierte 44/42 MAPK wurde mit dem p44/42 MAPK Ak und unphosphorylierte MAPK mit dem 44/42 MAPK Ak detektiert. Die Phosphorylierung der 44/42 MAPK wurde erst nach Inkubation der RGC mit dem anti-Agrin Ak signifikant hochreguliert, wohingegen die Menge an Gesamt-44/42 MAPK unbeeinflusst blieb (Abb.16, A). Im Gegensatz dazu war in RGC die mit aufgereinigten IgGs aus dem Präimmunserum (vgl. Abschnitt 5.4) oder mit dem MAPK spezifischen Inhibitor PD98059 (hier PD) behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten RGC (Abb.16, A: -Ak; B: gestrichelte Linie bei eins auf der Y-Achse), die Phosphorylierung der 44/42 MAPK nicht beeinflusst. Stark phosphorylierte 44/42 MAPK konnte auch im Gehirn sieben Tage alter Hühnerembryonen detektiert werden. Möglich wäre es deshalb, dass die Phosphorylierung der 44/42 MAPK ebenfalls in weiteren Neuronen des sich entwickelnden ZNS TM-Agrin abhängig reguliert wird. Nicht sicher ist allerdings, ob die *in vivo* detektierte Phosphorylierung durch TM-Agrin induziert wurde, noch ob die 44/42 MAPK in neuronalen oder nicht-neuronalen Zellen phosphoryliert wird. Die densitometrische Auswertung mehrerer Western Blots zeigt, dass nach dreißigminütiger anti-Agrin Ak Inkubation die Phosphorylierung der p44/42 MAPK um etwa ein fünffaches, im Vergleich zu unbehandelten RGC (Abb.16, B: gestrichelte Linie bei eins auf der Y-Achse), zugenommen hat. Die Behandlung mit dem 44/42 MAPK spezifischen Inhibitor PD98059 führte zu einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung. Vergleicht man die Kinetiken der Tyrosinphosphorylierung in Abb.10 B mit der Kinetik der 44/42 MAPK Phosphorylierung (Abb.17, B) erkennt man, dass diese sehr ähnlich sind. Die Ergebnisse lassen somit die Vermutung zu, dass Bande B bei ca. 45 kDa in Abb.10 die 44 MAPK ist, da diese ausschließlich an Tyrosinresten phosphoryliert wird. Ausserdem konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass nicht nur die Phosphorylierung der 44 MAPK, sondern offensichtlich auch die Phosphorylierung der 42 MAPK, welche spezifisch an Threoninresten phosphoryliert wird, TM-Agrin abhängig hochreguliert wird (untere Bande in Abb.16, A und B).

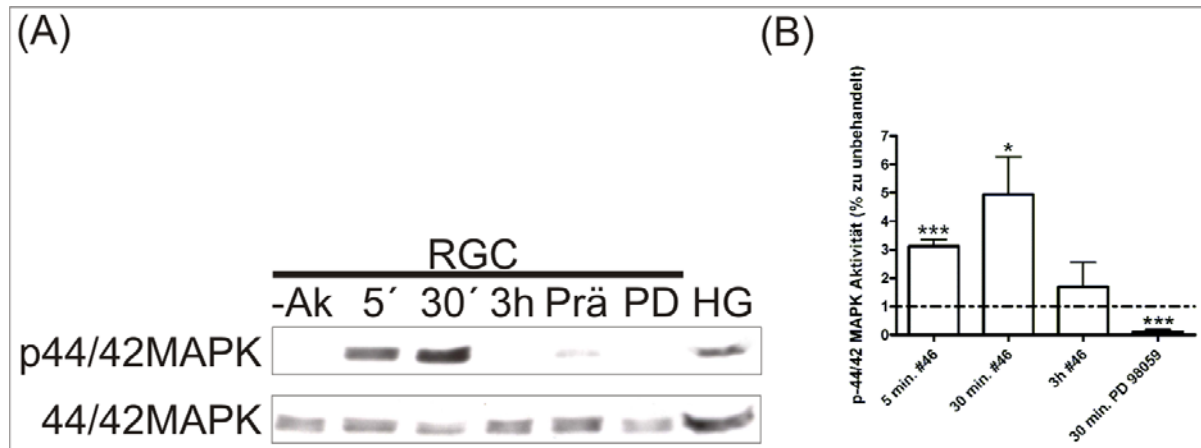


Abb.16: Analyse der Phosphorylierung der 44/42 MAPK in RGC und Gesmathirn. RGC Zelllysate unbehandelter (-Ak), mit anti-Agrin Ak behandelte (5', 30', 3 Std.), mit Präimmun-IgG für 30 min. behandelte (Prä) und mit PD98059 (PD) behandelte Zellen (1 Std. Vorinkubation danach 30 min. zusammen mit anti-Agrin Ak) wurden mittels Western Blot mit dem phosphospezifischen p44/42 MAPK Ak und dem 44/42 MAPK Ak, der sowohl aktive als auch inaktive 44/42 MAPK erkennt, analysiert. Die Phosphorylierung der 44/42 MAPK wurde bereits nach wenigen Minuten anti-Agrin Ak Zugabe im Vergleich zu unbehandelten RGC (Abb.12, A: -Ak; B: gestrichelte Linie bei eins auf der Y-Achse) hochreguliert. Präimmun-IgGs waren nicht in der Lage die Phosphorylierung der 44/42 MAPK zu beeinflussen. Die Inkubation mit PD98059 führte zu einer Reduktion der Phosphorylierung. Im Gehirn 7 Tage alter Hühner findet man ebenfalls phosphorylierte 44/42 MAPK. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Resultaten. **(B)** Die densitometrische Auswertung zeigt, dass die 44/42 MAPK nach 30 min. anti-Agrin Zugabe am stärksten phosphoryliert ist. Die Behandlung mit PD98059 führte zu statistisch extrem signifikanten Reduktion der 44/42 MAPK Phosphorylierung bis unter den Level unbehandelter RGC (Abb.16, A: -Ak; B: gestrichelte Linie bei eins auf der Y-Achse) Die Auswertung wird dargestellt als Prozent Erhöhung zu unbehandelten RGC nach Normalisierung der relativen Bandenschwärzung des p44/42 MAPK Signals zum 44/42 MAPK Signal. Die Fehlerbalken entsprechen +/- SEM mit N=3. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ one-sample t -test.

5.5.2 Für die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer ist eine aktive Mitogen aktivierte Protein Kinase erforderlich

Um zu untersuchen ob die durch TM-Agrin induzierte Phosphorylierung der 44/42 MAPK wichtig für die Bildung von Ausläufern ist, wurden auswachsende RGC mit dem selektiven MAPK Kinase Inhibitor PD98059 (Alessi et al., 1995; Pang et al., 1995) in unterschiedlichen Konzentration eine Stunde lang vorinkubiert und anschließend mit dem anti-Agrin Ak zusammen drei Stunden behandelt. Die Inkubation ausschliesslich mit PD98059 beeinflusste weder die Morphologie der RGC Wachstumskegel noch die der RGC Axone. Bei Axonen, die jedoch mit anti-Agrin Ak inkubiert wurden um die Bildung von Ausläufern zu induzieren, führte die Behandlung mit PD98059 konzentrationsabhängig zu einer starken Reduktion der Ausläuferzahl (Abb.17). Die Ausläuferzahl konnte nach Behandlung mit PD98059 hingegen nicht vollständig, also bis hin zum Level unbehandelter RGC (Abb.17, K), verringert werden. Die Inkubation von RGC mit höheren Konzentrationen an PD98059 (nicht gezeigt), resultierte dagegen in einem Kollaps der axonalen Wachstumskegel, weshalb diese PD98059 Konzentrationen nicht mit in die Auswertung

aufgenommen wurden. Die Ergebnisse sind dennoch konsistent mit der Hypothese, dass die 44/42MAPK wichtig für die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer ist.

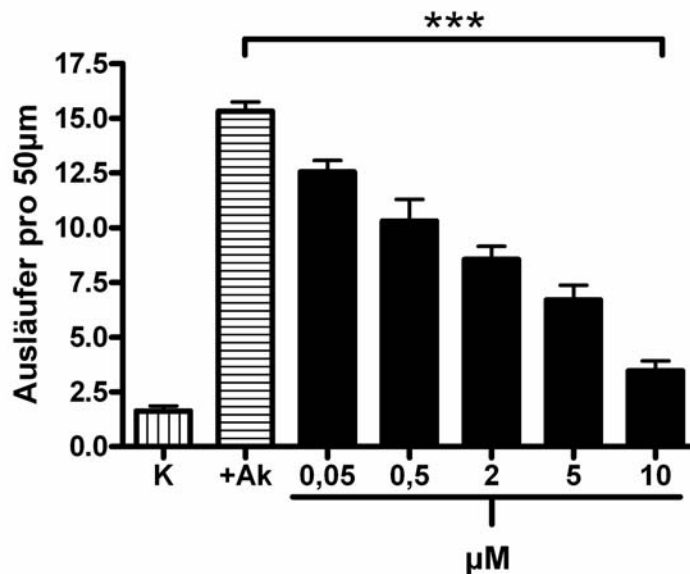


Abb.17: Analyse der TM-Agrin induzierten Ausläuferbildung nach Behandlung mit dem MAPK Kinase Inhibitor PD98059. RGC Kulturen wurden entweder unbehandelt (K), 3 Std. mit anti-Agrin Ak (+Ak) oder mit den angegebenen Konzentrationen an PD98059 (0,05µM – 10µM) für 1 Std. vorinkubiert und anschließend zusammen mit dem anti-Agrin Ak für weitere 3 Std. inkubiert. Konzentrationsabhängig ist eine deutliche Reduktion in der Bildung von Ausläufern zu erkennen. Die Behandlung mit PD98059 führt jedoch nicht zu einer Reduktion bis hin zum Level unbehandelter RGC (K). Die Fehlerbalken entsprechen +/- SEM mit N=3. *** $p < 0,001$; unpaired t -test.

5.6 Fyn wird stromaufwärts von der Mitogen aktivierten Protein Kinase aktiviert

TM-Agrin induziert sowohl die Aktivierung der Fyn- als auch der 44/42 MAP-Kinase. Die Aktivierung beider Kinasen ist notwendig für die TM-Agrin abhängige Bildung von Zellausläufern. Es stellt sich also die Frage, ob es sich dabei um konvergierende oder parallele Signalwege handelt und ob eine der beiden Signalwege notwendig für den jeweiligen Anderen ist. Um dies zu untersuchen, wurden RGC mit den spezifischen Inhibitoren für die Src-Kinase Familie (PP1) und die MAP-Kinase (PD98059) für eine Stunde vorinkubiert und danach für fünf Minuten gemeinsam mit dem anti-Agrin Ak auf den RGC belassen. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und mit den phosphospezifischen Ak gerichtet gegen Fyn (Abb.18, A: pY⁴¹⁸) und gegen die 44/42 MAPK (Abb.18 A: p44/42 MAPK) sowie den Ak, welche Gesamt- Fyn (Abb.18 A: Fyn) und Gesamt-44/42 MAPK (Abb.18 A: 44/42 MAPK) erkennen, analysiert. Wenn Fyn stromaufwärts der 44/42 MAPK aktiviert wird, würde man bei diesem Experiment erwarten, dass die Phosphorylierung von Fyn durch den MAPK spezifischen Inhibitor PD98059 gehemmt wird. Sollte hingegen die 44/42 MAPK

stromaufwärts von Fyn aktiviert werden, würde man erwarten, dass die Phosphorylierung der MAPK durch den Src-Familie Kinase spezifischen Inhibitor PP1 inhibiert wird. Die Resultate in Abbildung 18 zeigen, dass die Phosphorylierung von Fyn durch PP1 jedoch nicht durch PD98059 inhibiert wird (Abb.18, A; pY⁴¹⁸). Die Menge an Gesamt-Fyn wurde hingegen nicht durch die beiden Inhibitoren beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde sowohl nach Behandlung mit dem Src-Kinase spezifischen Inhibitor PP1 als auch mit PD98059 die TM-Agrin induzierte Phosphorylierung der 44/42 MAPK vollständig inhibiert. Die Menge an Gesamt-Protein blieb hier ebenfalls unbeeinflusst. Dieses Ergebnis zeigt, dass inaktiviertes Fyn die Phosphorylierung der 44/42 MAPK verhindert. Zudem ist das Ergebnis konsistent mit der Hypothese, dass Fyn und die 44/42 MAPK über die gleiche Signalkaskade TM-Agrin abhängig die Bildung von Ausläufern induzieren, und dass Fyn stromaufwärts der 44/42 MAPK aktiviert wird.

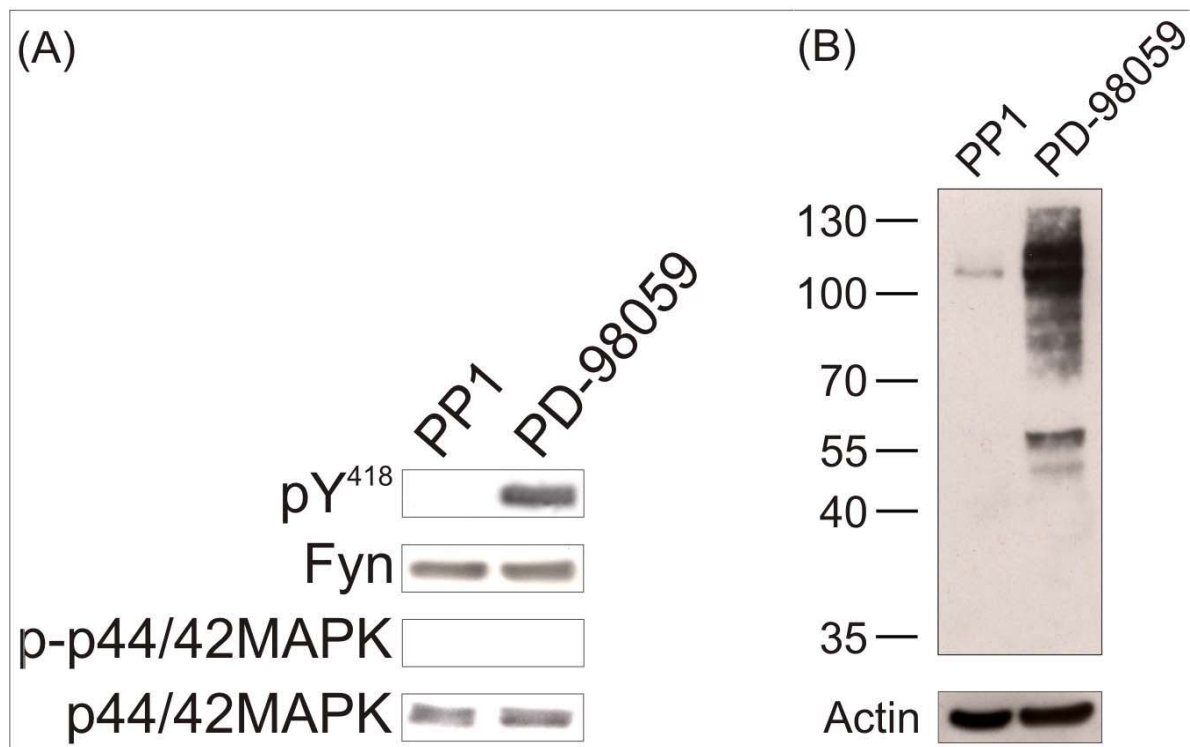


Abb.18: Untersuchung der zeitlichen Abfolge der Phosphorylierung von Fyn und der 44/42 MAPK. (A) RGC wurden 1 Std. mit den jeweiligen Kinase-spezifischen Inhibitoren (PD98059 für 44/42 MAPK und PP1 für Fyn) vorinkubiert und anschließend für weitere 5 min. zusammen mit dem anti-Agrin Ak inkubiert. Danach erfolgte die Lyse der Zellen. Die Lysate wurden mittels Western Blot mit dem phosphospezifischen p44/42 MAPK Ak, dem 44/42 MAPK Ak, der sowohl die aktive als auch die inaktive Form der 44/42 MAPK erkennt, dem phosphospezifischen pY⁴¹⁸ und dem FYN3 Ak, der Gesamt-Fyn erkennt (Fyn), analysiert. Die Phosphorylierung der 44/42 MAPK kann sowohl durch PP1 als auch PD98059 inhibiert werden. Die Phosphorylierung von Fyn kann nur durch PP1 aber nicht PD98059 inhibiert werden. (B) RGC wurden analog zu den in Abb. A beschriebenen Methoden behandelt. Die Western Blots wurden anschließend jedoch mit dem 4G10 Ak detektiert. Die Behandlung der RGC mit PP1 führte zu einer verminderten Phosphorylierung fast aller Tyrosinphosphorylierter Proteine. Die Behandlung mit PD98059 hingegen hatte nur Einfluss auf die Phosphorylierung der Banden bei ca. 45 kDa und ca. 35 kDa (vgl. Abb. 10A). Gezeigt sind representative Western Blots von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Resultaten

Um das vorherige Ergebnis zu stützen und somit sicherzustellen, dass es sich bei dem Fyn- und 44/42 MAPK-Signalweg um konvergierende Signalwege handelt und zudem Fyn stromaufwärts der 44/42 MAPK aktiviert wird, wurden RGC, wie bereits oben beschrieben, behandelt. Allerdings wurden die Western Blots abschließend mit dem 4G10 Ak, welcher alle Tyrosinphosphorylierten Proteine erkennt, analysiert. Als Ladekontrolle wurde der anti-Aktin Ak verwendet. Die Inkubation mit dem Src-Kinase spezifischen Inhibitor PP1 führte zur Inhibierung der Phosphorylierung von nahezu allen Proteinen. Vor allem die in Abbildung 10A durch anti-Agrin Ak hoch regulierten Banden bei ca. 60 kDa, ca. 45 kDa und 35 kDa konnten nicht mehr detektiert werden (Abb.18, B: Spur 1). Im Gegensatz dazu resultierte eine Behandlung mit dem MAP-Kinase spezifischen Inhibitor PD98059 nicht in einer verminderten Phosphorylierung der Bande bei ca. 60 kDa, sondern nur der Banden bei ca. 45 kDa und der Bande bei ca. 35 kDa (Abb.18, B: Spur 2 vgl. auch Abb.10A). In Übereinstimmung mit dem vorherigen Resultat, dass Fyn in einem konvergierenden Signalweg stromaufwärts der 44/42 MAPK aktiviert wird und der Vermutung, dass es sich bei der 60 kDa Bande um Fyn und bei der 45 kDa Bande um die 44 MAPK handelt, resultiert die Inkubation mit PD98059 in einer reduzierten Phosphorylierung der 44 MAPK, nicht jedoch von Fyn. Die Inkubation mit PP1 führt hingegen zu einer verminderten Phosphorylierung sowohl von Fyn als auch von der 44 MAPK. Ausserdem ergab die Untersuchung, dass die nicht charakterisierte, jedoch durch TM-Agrin induzierte Phosphorylierung der Bande bei ca. 35 kDa stromabwärts der Phosphorylierung von Fyn und der 44 MAPK erfolgen muss, da sowohl eine Inkubation mit PP1 als auch mit PD98059 in einer verminderten Phosphorylierung der Bande bei 35 kDa resultiert.

5.7 Zyklisches Guanosinmonophosphat, aber nicht zyklisches Adenosinmonophosphat, und die Phosphatidylinositol-3 Kinase sind notwendig für die Bildung von Ausläufern

Zyklisches Adenosin- (cAMP) und Guanosinmonophosphat (cGMP) sind intrazelluläre, sekundäre Botenstoffe. Für beide Moleküle konnte bereits gezeigt werden, dass sie die Bildung von Ausläufern in anderen Systemen, abhängig von der 44/42 MAPK und/oder Fyn, beeinflussen (Charles et al., 2003; Ivins et al., 2004; Schmid et al., 2000; Weeks et al., 1991). Um zu untersuchen ob cAMP und cGMP ebenso für die durch TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern notwendig sind, wurden RGC mit zunehmenden Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren Rp-cAMPS (Abb.19, A: cAMP Inhibitor; (Rothermel et al., 1984) und Rp-8-CPT-cGMPS (Abb.19, C: cGMP Inhibitor; (Butt et al.,

1994) für 30 Minuten vorinkubiert und danach für weitere drei Stunden mit anti-Agrin Ak inkubiert. Die Inhibierung des cGMP, nicht aber des cAMP Signals, führte konzentrationsabhängig zu einer signifikanten, jedoch nicht vollständigen, Reduktion der Bildung von Ausläufern (Abb. 19 A, C).

Um zu analysieren ob die Zugabe von cAMP, aber vor allem cGMP, ausreichend für die de novo Bildung von Ausläufern ist, wurden RGC für drei Stunden mit dem zellpermeablen cGMP Analogon dibutyryl-cGMP (db-cGMP) und dem cAMP Analogon dibutyryl-cAMP (db-cAMP) behandelt. Ausschliesslich db-cGMP (Abb.20, D), aber nicht db-cAMP (Abb.20, B) konnte die Bildung von Ausläufern induzieren. Somit kann festgehalten werden, dass cGMP, jedoch nicht cAMP, eine Rolle bei der Bildung von TM-Agrin induzierten Ausläufern spielt. Darüber hinaus kann durch Zugabe von db-cGMP zu RGC Kulturen, ohne vorherige Aktivierung von TM-Agrin, die Bildung von Ausläufern induziert werden.

Um sicherzustellen, dass die Bildung von Ausläufern durch cGMP nicht unabhängig von TM-Agrin erfolgt, wurden anti-Agrin Ak zusammen mit db-cGMP für drei Stunden auf RGC Kulturen inkubiert. Ein additiver Effekt, also eine vermehrte Bildung von Ausläufern über den jeweiligen Maximallevel hinaus (Abb.19, E), konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb.19, E). Dieses Ergebnis und die Beobachtung das Rp-8-CPT-cGMPS die Bildung von Ausläufern inhibieren kann, lassen den Schluss zu, dass cGMP notwendig für die durch TM-Agrin induzierte Signalkaskade und Ausläuferbildung ist.

Es wurde bereits beschrieben, dass auch die PI-3 Kinase zusammen mit weiteren signaltransduzierenden Molekülen die Bildung von Ausläufern und somit die Differenzierung von Zellen veranlasst (Sanchez et al., 2004). Um zu überprüfen ob die PI-3 Kinase als signaltransduzierendes Molekül in der TM-Agrin vermittelten Bildung von Ausläufern mitwirkt, wurden RGC mit dem selektiven PI-3 Kinase Inhibitor Wortmanin für dreieinhalb Stunden inkubiert, davon drei Stunden zusammen mit dem anti-Agrin Ak. Die Auswertung des Versuches in Abbildung 19 F zeigt, dass die PI-3 Kinase die Bildung von Ausläufern nicht beeinträchtigt, da deren Inhibierung durch zunehmende Wortmanin Konzentrationen nicht zu einer Reduktion von Ausläufern führt.

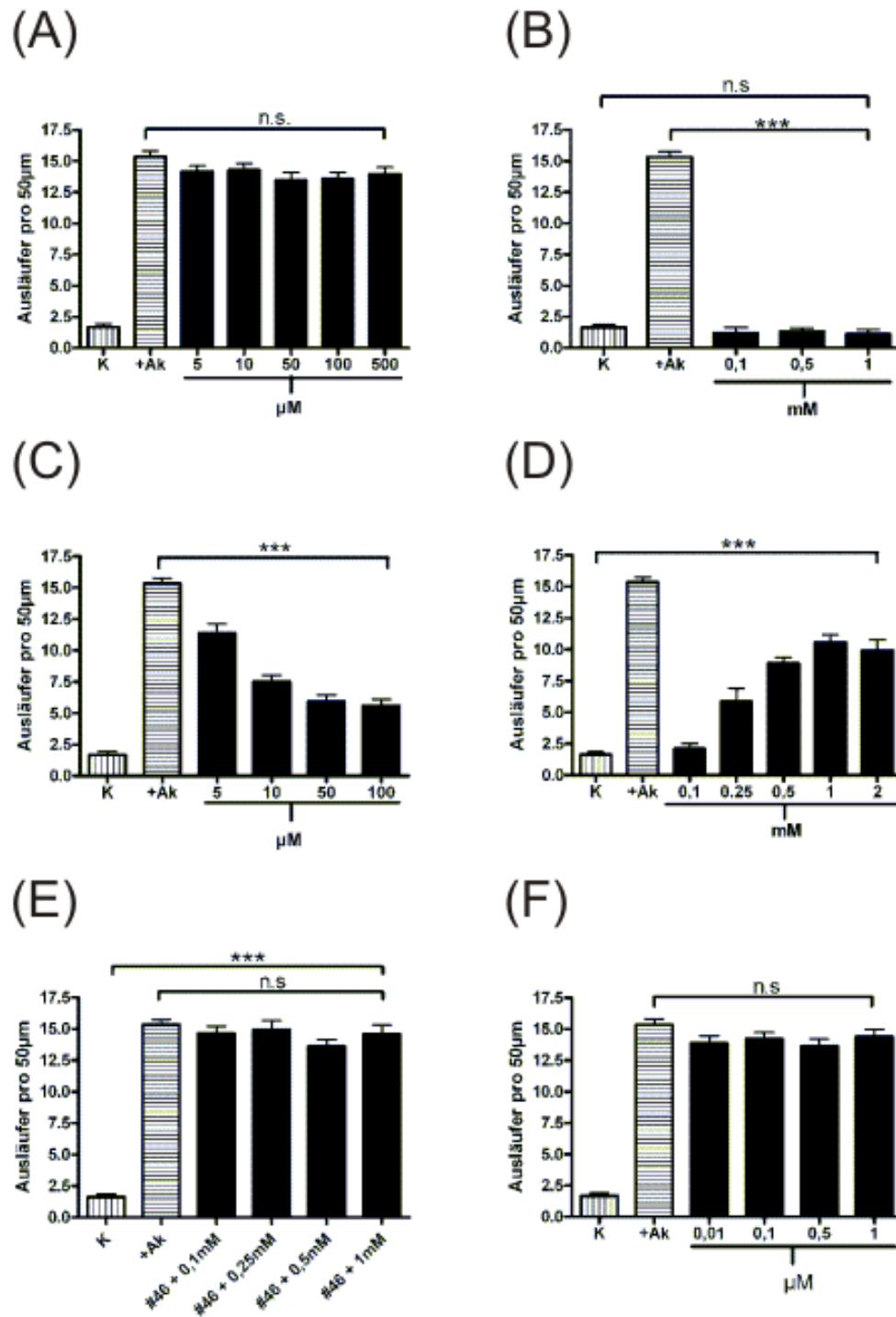


Abb.19: Behandlung von RGC mit verschiedenen Inhibitoren und sekundären Botenstoffen. RGC wurden entweder unbehandelt (K), 3 Std. mit anti-Agrin Ak (+Ak) oder 30 min. mit Rp-cAMPS (A) oder Rp-8-CPT-cGMPS (C) oder Wortmanin (F) vorinkubiert und danach anti-Agrin Ak für weitere 3 Std. hinzugegeben. Die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer konnte durch Rp-8-CPT-cGMPS (C), aber nicht Rp-cAMPS (A), und Wortmanin (F) signifikant verringert werden. Die dreistündige Inkubation mit den cGMP und cAMP Analoga (db-cGMP und db-cAMP) führte im Falle von db-cGMP (D), jedoch nicht db-cAMP (B), zur Bildung von Ausläufern. Die gleichzeitige Behandlung von RGC mit anti-Agrin Ak und db-cGMP für 3 Std. konnte das Maximum allein durch anti-Agrin Ak Zugabe gebildeter Ausläufer nicht übertreffen (E). Die Fehlerbalken entsprechen $\pm$ SEM mit N=3. *** $p < 0,001$; n.s. $p > 0,05$; unpaired t -test.

5.8 Die Bildung von Ausläufern ist Kalzium abhängig

Kalzium spielt eine wichtige Rolle bei vielen zellulären Funktionen. Um zu untersuchen ob Kalzium einen Einfluss auf die TM-Agrin-abhängige Bildung von Ausläufern hat, wurden RGC mit zunehmenden Konzentrationen an BAPTA-AM für zehn Minuten vorinkubiert und im Anschluss für weitere drei Stunden mit dem anti-Agrin Ak zusammen behandelt. BAPTA-AM kann die Zellmembran passieren und wird intrazellulär durch zytosolische Esterasen zu dem starken Kalzium Chelator BAPTA gespalten (Thaler und Haimo, 1990). BAPTA inhibierte konzentrationsabhängig die Bildung von Ausläufern (Abb.20, A), was darauf hinweist, dass intrazelluläres Kalzium notwendig für die Ausläuferbildung ist.

Um ferner herauszufinden ob dieses notwendige Kalzium aus dem Extrazellularraum oder aus intrazellulären Organellen stammt, wurden RGC drei Stunden lang sowohl mit anti-Agrin Ak als auch mit Kobalt Chlorid (CoCl), einem unspezifischen Kalziumkanal Blocker, inkubiert. Die Bildung von Ausläufern konnte ebenfalls durch CoCl konzentrationsabhängig inhibiert werden (Abb.20, B). Dieses Ergebnis zeigt somit, dass das Einströmen von Kalzium aus der extrazellulären Umgebung unabdingbar für die durch TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern ist.

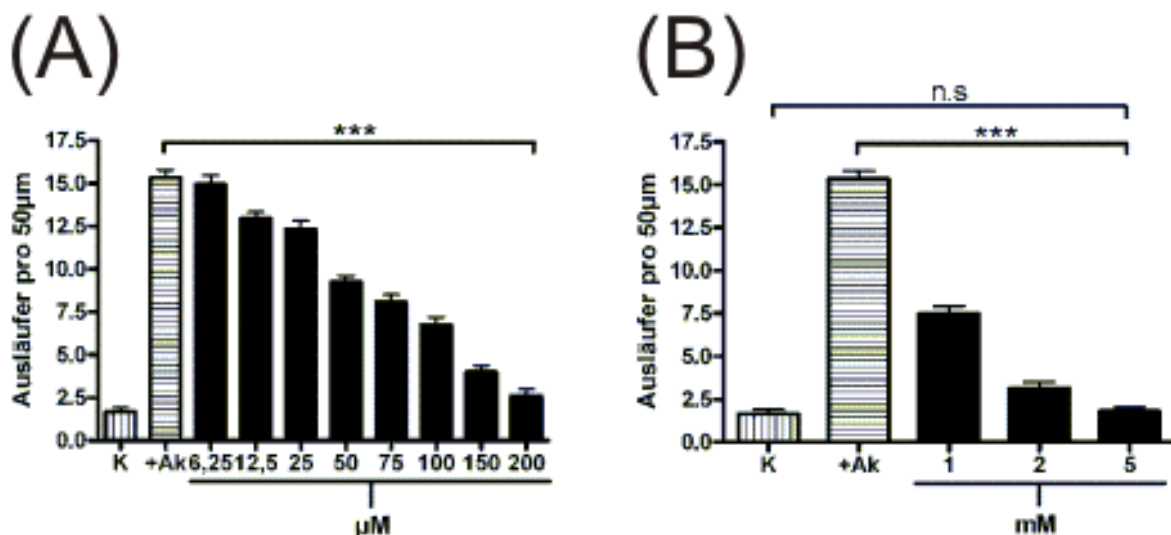


Abb.20: Analyse der Ausläuferbildung in Bezug auf die Abhängigkeit von Kalzium. RGC wurden entweder unbehandelt (K) oder 3 Std. mit anti-Agrin Ak (+Ak) oder 10 min. mit BAPTA-AM vorinkubiert und anschließend für weitere 3 Std. mit anti-Agrin Ak inkubiert (A) oder anti-Agrin Ak wurden parallel mit CoCl für 3 Std. inkubiert (B). Sowohl die Behandlung mit BAPTA-AM als auch mit CoCl führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Bildung von Ausläufern. Die Fehlerbalken entsprechen +/- SEM mit N=3. *** $p < 0,001$; n.s. $p > 0,05$; unpaired t -test.

5.9 Der Cocksackie-Adenovirus Rezeptor interagiert mit TM-Agrin und beeinflusst die Bildung von Ausläufern

Die TM-Agrin-abhängige Signalkaskade kann *in vitro* mittels Aggregation mehrerer TM-Agrin Moleküle in Folge von Überexpression oder Inkubation mit anti-Agrin spezifischen polyklonalen Ak aktiviert werden (Annies et al., 2006). Die Aktivierung von TM-Agrin wird somit relativ unphysiologisch erzeugt. Die daraus resultierende Reorganisation des Aktin Zytoskeletts und anschließende Bildung Filopodien-ähnlicher Ausläufer ist hingegen nicht unphysiologisch. Deshalb stellt sich die Frage, wie TM-Agrin *in vivo* die Bildung Filopodien-ähnlicher Ausläufer induziert. Einige Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, dass der Cocksackie-Adenovirus Rezeptor (CAR) eine wichtige Rolle bei der Initiierung der TM-Agrin induzierten Signalkaskade spielen könnte. Erstens: Mit Hilfe einer analytischen Ultrazentrifuge konnte bereits gezeigt werden, dass rekombinantes CAR-Fc an gereinigtes Agrin bindet (F.G. Rathjen, unpublizierte Beobachtungen). Zweitens: CAR wird entwicklungsabhängig im gesamten Gehirn exprimiert (Honda et al., 2000). Drittens: CAR ist ebenso wie Agrin an der NMJ lokalisiert (S. Kröger. und F.G. Rathjen, unpublizierte Beobachtungen) und viertens: Anti-CAR Fab Fragmente hemmen die Funktion von Agrin an der NMJ respektive die Aggregation des AChR. (S. Kröger und F.G. Rathjen, unpublizierte Beobachtungen). Ein weiterer Hinweis dafür, dass CAR ebenfalls die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern beeinflussen könnte, liefern die in dieser Arbeit gemachten Beobachtung, dass CAR, genauso wie TM-Agrin, in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen in lipid rafts angereichert ist (siehe Abb. 5 und 6).

5.9.1 CAR bindet an TM-Agrin

Um festzustellen ob CAR die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern beeinflusst, wurde zunächst untersucht ob CAR überhaupt an TM-Agrin bindet. Hierzu wurden Lysate aus dem Gesamthirn sieben Tage alter Hühnerembryonen hergestellt und anschließend eine Immunopräzipitation (IP) mit dem polyklonalen anti-Agrin Ak durchgeführt. Ein Teil der hergestellten Lysate wurde unbehandelt zusammen mit den immunopräzipitierten Komplexen per Western Blot mit dem polyklonalen anti-Agrin Ak, dem polyklonalen 54 IgG, der an CAR bindet, und dem monoklonalen Antikörper G4, der an das „neuron glia cell adhesion molecule“ (NgCAM) bindet, analysiert. NgCAM diene als Negativkontrolle, da es nicht an Agrin bindet. Im Gesamthirn Lysat (Abb.21, Ly) wurde sowohl Agrin, welches aufgrund seiner Glykosylierung als breite Bande bei etwa 600 kDa bandiert, als auch CAR bei etwa 46 kDa und NgCAM, mit seinem typischen Bandenmuster,

bei 210 kDa und 135 kDa detektiert. In der IP konnte stark angereichert Agrin, aber auch CAR, sowie die schwere Kette des polyklonalen Ak, der für die IP verwendet wurde, aber nicht NgCAM, nachgewiesen werden (Abb.21, IP). Die Bande bei 55 kDa in der IP repräsentiert die schwere Kette des polyklonalen anti-Agrin Ak, der für die IP verwendet wurde.

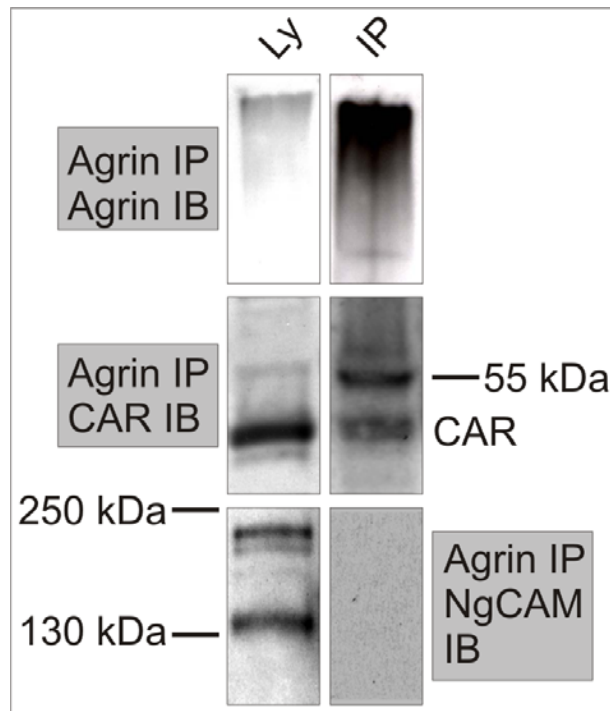


Abb.21: Koimmunopräzipitation von Agrin im Gesamthirn von E7 Hühnern. Die Gehirne von E7 Hühnerembryonen wurden lysiert und mit dem polyklonalen anti-Agrin Ak immunopräzipitiert. Zur Kontrolle wurde vor der Immunopräzipitation ein Teil des Lysates abgenommen und für die spätere Analyse verwahrt. Die immunpräzipitierten Komplexe und die Lysate wurden mittels Western Blot mit dem anti-Agrin Ak, dem monoklonalen Ak G4 (NgCAM) und dem polyklonalen 54 IgG (CAR) untersucht. Agrin, CAR und NgCAM konnten in dem Lysat aber ausschließlich Agrin und CAR in der IP detektiert werden. Die Bande bei 55 kDa repräsentiert die schwere Kette des für die IP verwendeten polyklonalen anti-Agrin Ak. Gezeigt sind representative Western Blots von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Resultaten

Dieses Experiment gibt keinen Aufschluss darüber, ob Agrin und CAR direkt oder indirekt interagieren. Ausserdem kann nicht differenziert werden, ob ein TM-Agrin/CAR-Komplex in neuronalen und/oder nicht-neuronalen Zellen des ZNS gebildet wurde. Die Bildung des TM-Agrin/CAR-Komplexes wurde am siebten Embryonaltag der Huhnentwicklung untersucht. Dieser Zeitpunkt entspricht der maximalen Wachstumsphase von Axonen im sich entwickelnden ZNS. Dies gilt auch z.B. für die RGC Axone, welche in den vorangehenden Untersuchungen verwendet wurden um die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern im ZNS zu untersuchen.

5.9.2 Der Cocksackie-Adenovirus Rezeptor kolokalisiert mit TM-Agrin

Um zu untersuchen ob CAR speziell auf ZNS Axonen bzw. TM-Agrin induzierten Ausläufern lokalisiert ist, wurden RGC in Kultur entweder ohne Behandlung mit dem anti-Agrin Ak (Abb.22, B, D und F) und nach dreistündiger Inkubation mit dem anti-Agrin Ak (Abb.22, A, C und D) fixiert und anschließend mit dem anti-Agrin Ak (Abb.22, A und B; rot) und einem gegen CAR gerichteten Ak (Abb.22, C und D, grün) gefärbt. Abbildung E und F sind Überlagerungen der Färbungen aus Bild A und C bzw. B und D. CAR konnte auf dem Axonschaft (Abb.22, C und D) und in den TM-Agrin induzierten Ausläufern (Abb. C) detektiert werden. Zudem kolokalisiert CAR mit TM-Agrin sowohl auf dem Axonschaft (Abb.22, E; Stern) als auch in den TM-Agrin induzierten Ausläufern (Abb.22, E; Pfeil). Diese Ergebnisse zeigen, dass CAR nicht nur an TM-Agrin im Huhn Gehirn bindet, sondern auch auf den TM-Agrin induzierten axonalen Ausläufern von RGC mit TM-Agrin kolokalisiert.

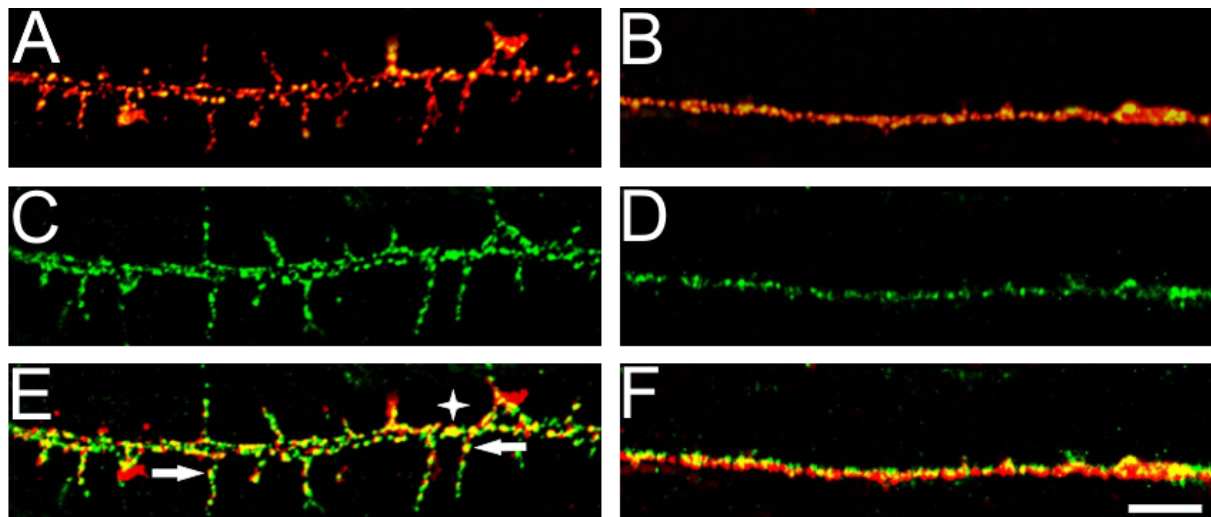


Abb.22: Verteilung von CAR auf ausläuferbildenden RGC Axonen. Die kultivierten Axone wurden entweder nicht mit anti-Agrin Ak (B, D, F) oder 3 Std. mit anti-Agrin Ak inkubiert (A, C, E) und fixiert. Die Axone wurden mit anti-Agrin Ak (A, B) oder mit anti-CAR Ak (C, D) gefärbt. E und F sind Überlagerungen von A und C bzw. B und D. CAR kolokalisiert mit TM-Agrin auf dem Axonschaft (E, Stern) und in den Ausläufern (Pfeile).

5.9.3 Cocksackie-Adenovirus Rezeptor überexprimierende Zellen bilden Ausläufer

Um herauszufinden ob CAR, analog zu TM-Agrin, durch Überexpression die Bildung von Ausläufern induzieren kann, wurden zum einen Zellen aus dem Tektum von E7 Hühnerembryonen und zum anderen HEK 293 und CHO Zellen mit einer cDNA, die für CAR codiert, nukleofektiert bzw. transfiziert. Parallel kultivierte tektale Zellen wurden als Kontrolle zudem mit dem pEGFP-N1 Leervektor (Abb.23, A und A') und TM-Agrin (Abb.23, D und D') transfiziert und untransfiziert (Abb.23, B) analysiert. Die tektalen Zellen

(Abb.23, A-D') wurden nach drei Tagen und die HEK 293 (Abb.23, E – E') und CHO Zellen (Abb.23, F) nach 24 Stunden fixiert und mit einem anti-FlagTag Ak, welcher das an CAR gekoppelte Flag-Epitop erkennt (C, E und F), detektiert. Die tektalen Zellen wurden zusätzlich mit dem neuronalen Marker MAP-2 gefärbt (Abb.23, A'; B; C' und D'), damit ausschliesslich tektale Neurone und nicht etwa nicht-neuronale Zellen, wie z.B. Astrozyten, analysiert werden. TM-Agrin transfizierte und pEGFP-N1 transfizierte, tektale Neurone wurden mit dem anti-GFP Ak detektiert. Die mit CAR cDNA transfizierten HEK 293 wurden zusätzlich mit Phalloidin (Abb.23, E') gefärbt. In Abbildung 23 D und D' kann man deutlich erkennen, dass TM-Agrin überexprimierende tektale Neurone, ebenso wie TM-Agrin überexprimierende nicht-neuronale Zellen (vgl. Abb. 4), eine Vielzahl von Ausläufern ausbilden. Untransfizierte (Abb.23, B) und mit Leervektor transfizierte Zellen (Abb. 23, A und A') bilden kaum Ausläufer aus. CAR überexprimierende tektale Neurone (Abb. 23, C und C'), nicht-neuronale HEK 293 (Abb.23, E und E') und CHO Zellen (Abb.23, F) bildeten, ebenso wie mit TM-Agrin transfizierte Zellen (siehe Abb.3), zahlreiche Ausläufer aus. Ein stark in den TM-Agrin induzierten Ausläufern exprimiertes Protein ist das Zytoskelettprotein Aktin (siehe Abb.3, C'). In dieser Untersuchung konnte unter Verwendung des selektiv an F-Aktin bindenden, fluoreszenkonjugierten Phalloidins gezeigt werden, dass Aktin auch in CAR induzierten Ausläufern lokalisiert ist (Abb. 23, E'). Die Resultate dieses Abschnittes zeigen, dass die Überexpression von CAR die Bildung zahlreicher Aktin-haltiger Ausläufer in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen induzieren kann. Ausserdem sind die Ausläufer in Bezug auf ihre Morphologie und zytoskeletale Proteinzusammensetzung den durch TM-Agrin induzierten Ausläufern ähnlich.

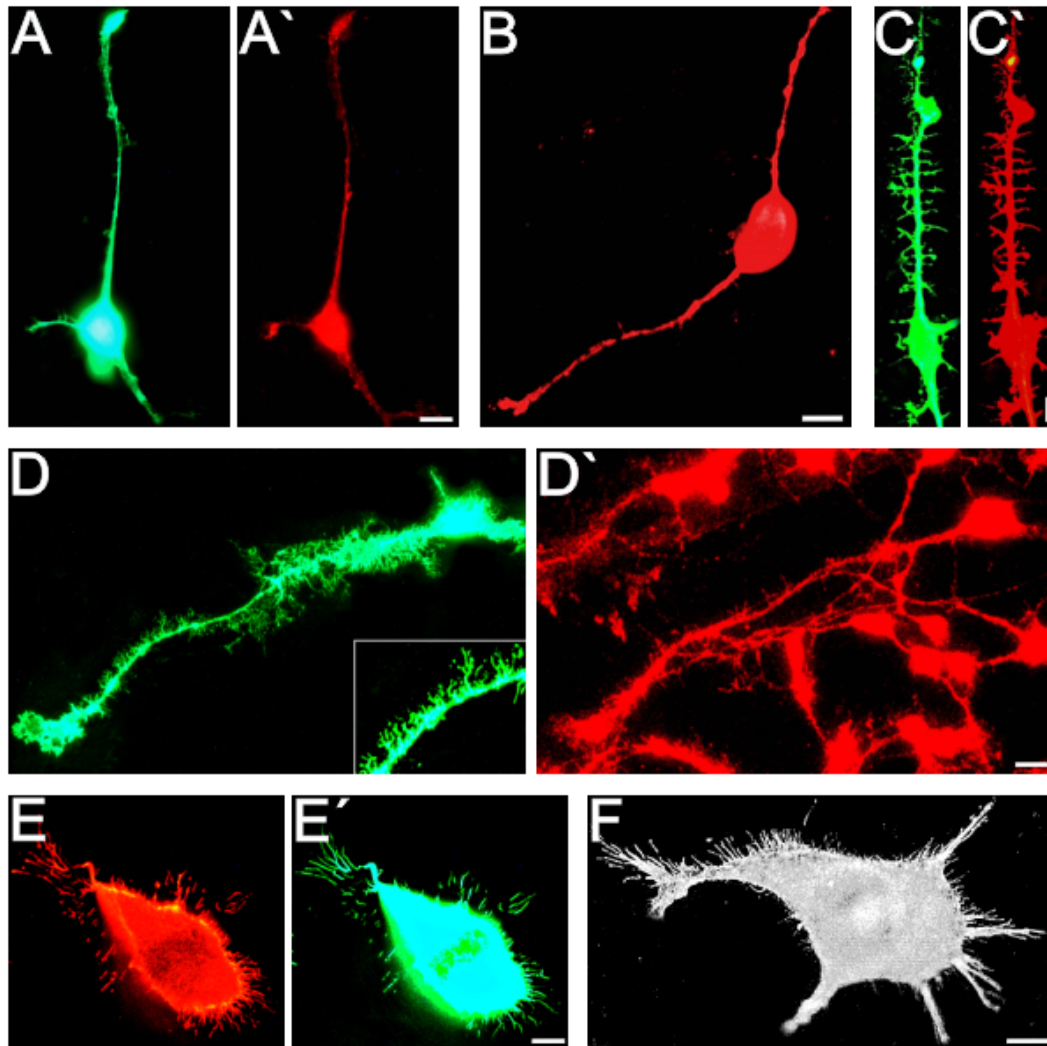


Abb.23: Heterologe Expression von CAR und TM-Agrin. Tectale Neurone (A-D'), HEK 293 (E, E') und CHO Zellen (F) wurden entweder nicht transfiziert (B) oder transient mit cDNA, die für den Leervektor pEGFP (A, A') oder TM-Agrin (D, D') oder CAR (C, C', E, E', F) kodiert, transfiziert. Die Zellen wurden mit anti-FlagTag Ak (C, E, F), anti-GFP Ak (A, D), anti-MAP-2 Ak (A', B, C', D') und Phalloidin (E') gefärbt. Die mit TM-Agrin und CAR cDNA transfizierten Zellen bilden im Gegensatz zu untransfizierten oder mit dem Leervektor transfizierten Zellen zahlreiche Ausläufer auf der Zelloberfläche bzw. entlang der Axone aus. Die Aktin Filamente erstrecken sich bis hin zu den Ausläuferspitzen (Pfeile in E, E'). (Skalierungsbalken = 10µm)

Um die Ausläufer induzierende Aktivität von CAR und TM-Agrin in neuronalen Zellen zu quantifizieren wurden parallel kultivierte tectale Neurone mit den jeweiligen cDNAs transfiziert und die Anzahl von Ausläufern pro 10 µm Neuritenlänge bestimmt. Als Kontrollen, um auszuschliessen, dass tectale Neurone ohnehin viele Ausläufer ausbilden, dienten tectale Neurone, die mit dem Leervektor pEGFP-N1 transfiziert wurden bzw. unbehandelte Neurone. Die Transfektion von CAR und TM-Agrin resultierte in der Bildung von etwa 4 Ausläufern pro 10 µm Neuritenlänge. Im Gegensatz dazu bildeten untransfizierte und mit dem Leervektor transfizierte Zellen im Mittel nur ca. 1 Ausläufer pro 10 µm Neuritenlänge aus. Hierbei handelt es sich um spontan auf tectalen Neuronen gebildete Ausläufer. Der Unterschied zwischen CAR- und TM-Agrin überexprimierenden tectalen Neuronen in Bezug auf die Ausläuferbildung pro 10 µm Neuritenlänge war allerdings nicht

signifikant. Der Unterschied zwischen CAR überexprimierenden und den Leervektor pEGFP-N1 überexprimierenden tektalen Neuronen hingegen war statistisch extrem signifikant.

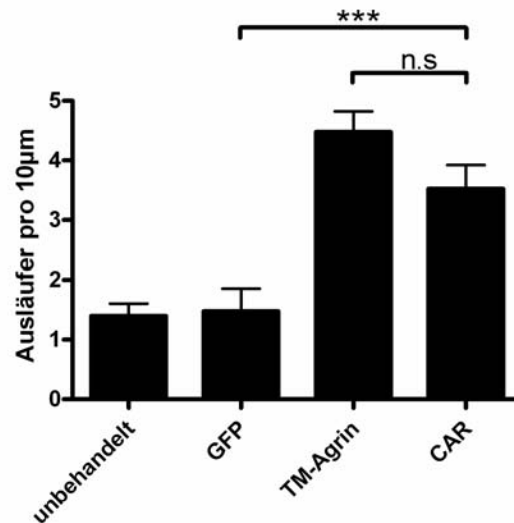


Abb.24: Quantifizierung der transienten Transfektion von tektalen Neuronen. Die Zellen wurden entweder nicht transfiziert (unbehandelt) oder mit CAR cDNA oder TM-Agrin cDNA oder der pEGFP-N1 Leervektor cDNA transfiziert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen fixiert und danach fluoreszenzmarkiert. Zur genaueren Bestimmung der Anzahl transfizierter Zellen wurden die Zellen zusätzlich mit DAPI markiert. Es wurde die Anzahl von Ausläufern pro 10 µm Neuritenlänge ermittelt. Die Fehlerbalken entsprechen +/- SEM mit N = 3. *** $p < 0,001$; n.s. $p > 0,05$; unpaired t -test.

5.9.4 Die Maskierung von CAR verhindert die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer

In dieser Arbeit konnten bereits einige Daten akkumuliert werden, die auf eine Rolle von CAR bei der TM-Agrin induzierten Bildung von Ausläufern hindeuten: CAR ist ebenso wie TM-Agrin in neuronalen wie nicht-neuronalen Zellen in lipid rafts angereichert. CAR bindet im ZNS an TM-Agrin. CAR kolokalisiert mit TM-Agrin auf TM-Agrin induzierten RGC Ausläufern. CAR induziert Ausläufer auf neuronalen und nicht-neuronalen Zellen, die zudem in Bezug auf ihre Morphologie, ihre Zusammensetzung und ihre Anzahl TM-Agrin induzierten Ausläufern ähnlich sind. Aufgrund dieser Resultate wurde die Hypothese aufgestellt, dass CAR eine Rolle bei der TM-Agrin-abhängigen Bildung von Ausläufern spielen könnte. Um dies zu untersuchen, wurden Bindungsstellen zwischen CAR und TM-Agrin, und somit eine mögliche Interaktion von beiden Molekülen auf RGC, mit Hilfe von Fab-Fragmenten von zwei unterschiedlichen polyklonalen anti-CAR Ak blockiert. Um die Spezifität der Hemmung zu gewährleisten wurden zwei verschiedene Fab-Fragmenten, die aus unterschiedlichen Immunisierungen stammen und deshalb ein unterschiedliches Epitopenmuster besitzen, für die Untersuchung verwendet. Bevor jedoch der Einfluss der Fab-Fragmente auf die Anzahl TM-Agrin induzierter Ausläufer untersucht werden konnte,

musste vorab gewährleistet werden, dass die verwendeten Fab-Fragmente nicht ohnehin einen Einfluss auf das Wachstum und die Morphologie von RGC ausüben. Die Inkubation von unbehandelten RGC mit Fab-Fragmenten für 16 Stunden (100 µg/ml) hatte allerdings weder einen Einfluss auf das Wachstum, noch auf die Morphologie oder die Adhäsion der analysierten RGC. Im ersten Versuch wurden RGC zunächst für 16 Stunden mit Fab-Fragmenten vorinkubiert, um mögliche Bindungsstellen für TM-Agrin innerhalb des CAR Proteins zu blockieren, und anschließend wurde die TM-Agrin abhängige Bildung von Ausläufern durch Zugabe von anti-Agrin Ak induziert. Die Vorbehandlung mit Fab 25 und Fab 54 führte konzentrationsabhängig zu einer signifikant verminderten Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer (Abb.25, A). Um auszuschliessen, dass eine Inkubation von RGC mit Fab-Fragmenten ohnehin die Bildung von Ausläufern beeinflussen kann, wurden parallel kultivierte RGC mit Fab-Fragmenten, gerichtet gegen zwei Oberflächenmoleküle (NgCAM und F11), die nicht mit TM-Agrin interagieren (siehe Abb. 21), inkubiert. Die Inkubation mit anti-F11 und anti-NgCAM Fab-Fragmenten resultierte nicht in einer reduzierten Bildung von Ausläufern im Vergleich zu ausschliesslich mit anti-Agrin behandelten Zellen (Abb.25, A).

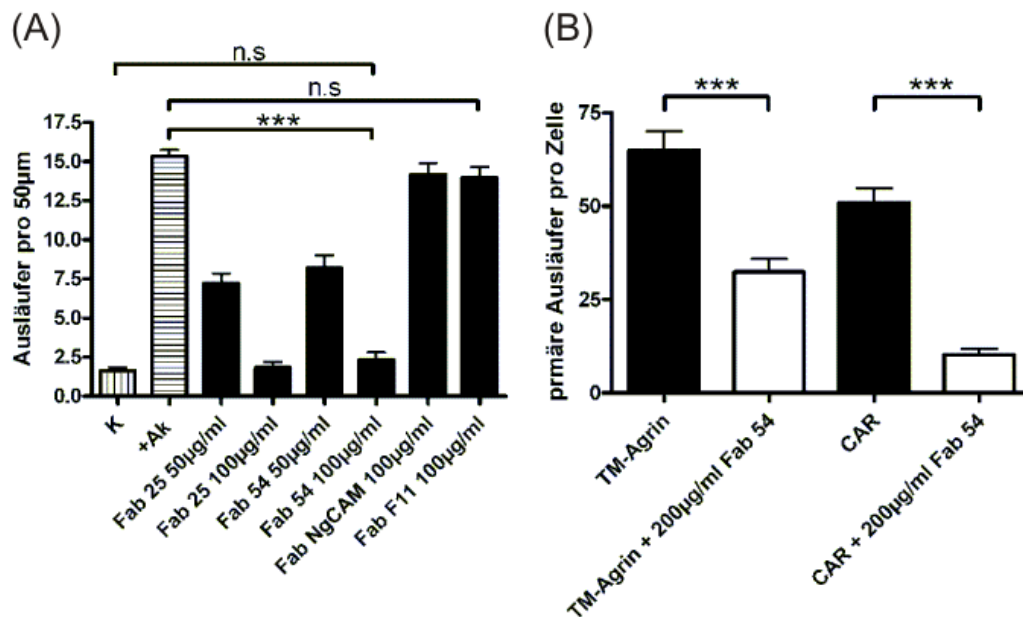


Abb.25: Maskierung von CAR durch Inkubation mit anti-CAR Fab-Fragmenten. (A) Auswachsene RGC wurden für 16 Std mit Fab-Fragmenten gerichtet gegen CAR (Fab 25, Säule 3 und 4 und Fab 54, Säule 5 und 6), gegen NgCAM (Fab NgCAM, Säule 7) und gegen F11 (Fab F11, Säule 8) vorinkubiert und dann für 3 Std. mit dem anti-Agrin Ak behandelt. Parallel kultivierte RGC wurden ausschliesslich mit anti-Agrin Ak (+Ak, Säule 2) inkubiert oder unbehandelt (K, Säule 1) analysiert. Die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern wurde konzentrationsabhängig durch Fab 25 und Fab 54, jedoch nicht durch Fab F11 oder Fab NgCAM, induziert. (B) HÉK 293 wurden transient mit cDNA, die für TM-Agrin (Säule 1 und 2) oder cDNA die für CAR (Säule 3 und 4) kodiert, transfiziert. Ein Teil der Kulturen wurde parallel zur Transfektion mit 200 µg/ml Fab-Fragmenten von einem polyklonalem anti-CAR Ak inkubiert (Säule 2 und 4). TM-Agrin sowie CAR überexprimierende Zellen bilden zahlreiche Ausläufer (Säule 1 und 3) (vgl. Abb. 3 und 23), jedoch Zellen, die zusätzlich mit Fab-Fragmenten kultiviert wurden, bilden signifikant weniger Ausläufer aus (Säule 2 und 4). Die Fehlerbalken entsprechen +/- SEM mit N = 3. *** $p < 0,001$; n.s. $p > 0,05$; unpaired t -test.

Um zu untersuchen ob die gegen CAR gerichteten Fab-Fragmente auch in nicht-neuronalen Zellen die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer inhibieren können, wurde TM-Agrin in HEK 293 Zellen überexprimiert. Bereits während des Transfektionsprozesses wurde Fab 54, in der in Abbildung 25 B angegebenen Konzentration, dem Medium zugefügt. Die Analyse transfizierter HEK 293 erfolgte nach 24 Stunden. Als Kontrolle wurden parallel kultivierte HEK 293 ausschliesslich mit TM-Agrin transfiziert. Um die Zellmorphologie und die Anzahl transfizierter Zellen besser bestimmen zu können, wurden diese mit dem anti-Agrin Ak und mit DAPI gefärbt. TM-Agrin transfizierte HEK 293, die mit Fab 54 inkubiert wurden (Abb.25, B: TM-Agrin + 200µg/ml Fab 54), bildeten signifikant weniger primäre Ausläufer aus als Zellen die nicht mit Fab 54 behandelt wurden (Abb.25, B: TM-Agrin).

Um zu überprüfen ob die Behandlung mit Fab 54 ebenso die Ausläuferbildung CAR überexprimierender Zellen hemmen kann, wurden HEK 293 mit cDNA, die für CAR kodiert, transfiziert und wie bereits oben beschrieben behandelt. CAR überexprimierende Zellen bildeten durchschnittlich ca. 50 Ausläufer pro transfizierte Zelle (Abb.25, B: CAR), wohingegen mit CAR transfizierte und gleichzeitig mit Fab 54 behandelte Zellen signifikant weniger Ausläufer ausbilden (Abb.25, B: CAR + 200µg/ml Fab 54).

Die in Abschnitt 5.9 erhaltenen Resultate sind konsistent mit der Hypothese, dass CAR eine entscheidende Rolle bei der durch TM-Agrin induzierten Bildung von Ausläufern in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen spielt. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass CAR und TM-Agrin in lipid raft Fraktionen angereichert sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CAR im sich entwickelnden ZNS an TM-Agrin bindet. Ferner ist CAR mit TM-Agrin auf TM-Agrin induzierten Ausläufern von ZNS Neuronen kolokalisiert und die Blockierung von CAR mit anti-CAR Fab-Fragmenten resultiert in einer stark verminderten Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer.

6 DISKUSSION

Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation war es die intrazelluläre Signalkaskade, die durch TM-Agrin induziert wird und in der Bildung von Ausläufern auf ZNS Axonen resultiert, zu charakterisieren und die Abfolge der intrazellulären Ereignisse zu analysieren. Die wesentlichen Ergebnisse der Arbeit sind:

TM-Agrin abhängig wird nicht nur in Axonen und Dendriten, sondern auch in nicht-neuronalen Zelltypen, die aus verschiedenen Spezies und unterschiedlichen Geweben stammen, eine Signalkaskade induziert, die zur Bildung von Ausläufern führt. TM-Agrin ist in lipid rafts angereichert. Darüber hinaus sind intakte lipid rafts notwendig für die Bildung und Aufrechterhaltung TM-Agrin induzierter Ausläufer. Die Src-Familie Kinase Fyn ist ebenfalls in lipid rafts angereichert, wird TM-Agrin abhängig phosphoryliert, und mit Hilfe pharmakologischer Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Fyn ein Bestandteil der TM-Agrin induzierten Signalkaskade ist. Weiterhin notwendig für die TM-Agrin induzierte Signalkaskade sind die 44/42 MAPK, deren Phosphorylierung abhängig ist von der vorherigen Aktivierung der Src-Familie Kinase Fyn, sowie die sekundären Botenstoffe cGMP und Kalzium. Ferner konnte mittels immunozytochemischer und biochemischer Untersuchungen gezeigt werden, dass das Transmembranprotein CAR mit TM-Agrin interagiert. Wird diese Interaktion gestört kommt es nicht zur Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer. Deshalb ist CAR wichtig für die Initiierung der durch TM-Agrin induzierten Ausläuferbildung.

6.1 Die Bildung TM-Agrin-induzierter Ausläufer: Ein Spezies- und Zelltyp-spezifischer Mechanismus?

TM-Agrin ist ein Typ II Transmembranprotein mit einer 34 Aminosäuren kurzen intrazellulären Domäne, die keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen aufweist. Die α -helikale, 23 Aminosäuren lange Transmembrandomäne ist stark konserviert, wohingegen die intrazelluläre Region zwischen verschiedenen Spezies nur zu etwa 50% identisch ist (Neumann et al., 2001). Sollte es sich bei der TM-Agrin induzierten Bildung von Ausläufern um einen universellen Mechanismus handeln, könnte daher zum einen die Transmembrandomäne, oder der konservierte Anteil der intrazellulären Region, eine wichtige Rolle spielen. Die extrazelluläre Region von TM-Agrin setzt sich aus mehreren unterschiedlichen Domänen zusammen und repräsentiert den Großteil des Proteins. Ausschliesslich die extrazelluläre Region ist in TM-Agrin und der löslichen N-terminalen

Isoform, NtA-Agrin, identisch und ausserdem zwischen verschiedenen Spezies konserviert (vgl. Abb.1). Die Entdeckung einer Transmembranform des Proteoglykans Agrin führte zu der Hypothese, dass TM-Agrin ein Rezeptor oder Korezeptor mit signaltransduzierenden Eigenschaften sein könnte. Die Aggregation von TM-Agrin durch Agrin spezifische polyklonale Ak hat eine Reorganisation des Zytoskeletts, und die Bildung von Ausläufern sowohl in ZNS als auch in PNS Axonen und Dendriten, zur Folge und unterstützt somit diese Hypothese (Annie et al., 2006). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen resultiert die Überexpression durch Transfektion von TM-Agrin cDNA in ZNS Neuronen in der Bildung zahlreicher Ausläufer, wohingegen die Unterdrückung der TM-Agrin Expression durch siRNA die Anzahl der Ausläufer drastisch reduziert. (McCroskery et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern nicht auf neuronale Zellen beschränkt ist, sondern dass eine Überexpression von TM-Agrin in nicht-neuronalen Zellen wie z.B. COS-7 Zellen aus Affen, PC-12 Zellen aus der Ratte, HEK 293 Zellen humanen embryonalen Nierenzellen (Abb.3, C-C'') primären Myoblasten aus Huhn (Abb.3, D) und CHO Zellen aus dem chinesischen Hamster (Abb.3, E) ebenso zur Bildung zahlreicher Ausläufer führt. Der Mechanismus scheint also sehr universell zu sein.

Im Gegensatz zu den durch TM-Agrin induzierten Filopodien-ähnlichen Ausläufern auf Axonen des ZNS bilden die Ausläufer auf den untersuchten nicht-neuronalen Zellen keine Wachstumskegel an ihren Spitzen aus. Ausserdem ziehen sich die Ausläufer auf neuronalen Zellen nach wenigen Minuten zurück, wohingegen die Ausläufer auf nicht-neuronalen Zellen bei längerer Kultivierung das gesamte Deckglas überwachsen. Dieser Unterschied resultiert vermutlich daraus, dass in den TM-Agrin überexprimierenden, nicht-neuronalen Zellen ständig neues TM-Agrin Protein synthetisiert wird und dadurch die Ausläufer stabilisiert werden. Im Gegensatz dazu ist die zur Verfügung stehende Menge von endogenem TM-Agrin in neuronalen Zellen deutlich begrenzter. Weiterhin enthalten Neurone andere Zytoskelettelemente wie z.B. die nicht-neuronale HEK 293 Zelllinie und HEK 293 Zellen bilden zudem *in vivo* keine Ausläufer aus. Übereinstimmend jedoch enthielten sowohl die Filopodien-ähnlichen Ausläufer auf Axonen des ZNS als auch auf den nicht-neuronalen Zellen zumindest das Zytoskelettprotein Aktin, welches sich bis hin zu den Ausläuferspitzen zog. Da in den Versuchen verschiedene Zelltypen wie z.B. Ovarienzellen, Nierenzellen und Myoblasten verwendet wurden, die zudem aus unterschiedlichen Spezies entstammen, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei der TM-Agrin-induzierten Bildung von Ausläufern um einen ubiquitär und evolutionär konservierten Mechanismus handelt.

Konsistent damit führt die Überexpression von TM-Agrin in weiteren Zelltypen wie z.B. der Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y aus dem Mensch (McCroskery et al., 2006) ebenfalls zur Bildung von Ausläufern.

6.2 Lipid rafts dienen als Signalplattform für die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern

Das Proteoglykan TM-Agrin induziert eine Signaltransduktionskaskade, die in der Bildung aktinhaltiger Ausläufer in verschiedenen Zelltypen unterschiedlicher Spezies resultiert (siehe Abb. 2 und 3). Viele Signaltransduktionswege haben ihren Ursprung in Glykosphingolipid- und Cholesterolreichen Mikrodomänen der Plasmamembran, lipid rafts genannt (Simons und Toomre, 2000). In diesen spezialisierten Bereichen der Plasmamembran reichern sich insbesondere signalweiterleitende Proteine an, interagieren miteinander und aktivieren somit unterschiedliche Signalkaskaden. Lipid rafts konnten in nahezu allen neuronalen Zelltypen wie z.B. auf Axonen und Dendriten von hippocampalen und kortikalen Neuronen (Butchbach et al., 2004; Hering et al., 2003; Ko et al., 2005) und in Gliazellen (Kramer-Albers et al., 2006) aber auch in den verschiedensten nicht-neuronalen Zellen wie z.B. der Niere (Thankamony und Knudson, 2006), dem Herzmuskel (Cavalli et al., 2007) und der Leber (Barfod et al., 2007) nachgewiesen werden. Lipid rafts finden sich zudem noch in jeder untersuchten Spezies von *C. elegans* (Sedensky et al., 2004) bis hin zum Mensch (Bae et al., 2007) und müssen daher als ubiquitär und evolutionär konserviert angesehen werden.

Folgende von mir erhaltenen Resultate unterstützen die Hypothese, dass lipid rafts ebenfalls für die TM-Agrin induzierte Signalkaskade notwendig sind. TM-Agrin ist in lipid rafts, isoliert aus neuronalen und nicht-neuronalen Zellen, enthalten. Lipid raft Bereiche kolokalisieren mit endogenem, aggregiertem TM-Agrin auf ZNS Axonen und in den induzierten lateralen Ausläufern der Axone. Die Desintegration von lipid rafts, durch das akute entfernen von Cholesterol aus der Zellmembran oder durch Hemmung der Biosynthese von Glykosphingolipiden hat eine drastische Reduktion TM-Agrin induzierter Ausläufer zur Folge. Vor allem aber wird TM-Agrin durch Zugabe von polyklonalen Ak zu kultivierten RGC in lipid raft Bereiche verschoben und kann dann nicht mehr in nicht-lipid raft Bereichen detektiert werden.

Konsistent mit der Vermutung, dass auch die TM-Agrin induzierte Signalkaskade konserviert sein muss, konnte TM-Agrin nach Triton-X100 Extraktion bei 4° C und anschließender Dichtegradientenzentrifugation in den untersuchten RGC (Abb.5) und in HEK 293 Zellen (Abb.4) in lipid rafts detektiert werden. In lipid rafts finden sich hauptsächlich

Glykosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine (Hooper, 1999; Tansey et al., 2000), die doppelt azetylierte α -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen, Src-Familie Kinasen (Resh, 1998) und palmitoylierte Proteine wie Hedgehog (Brown und London, 1998).

Weitere Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass nicht nur die zuvor beschriebenen Proteine, sondern auch das HSPG Syndecan in lipid rafts angereichert ist (Fuki et al., 2000; Tkachenko und Simons, 2002; Tkachenko et al., 2004). Syndecan interagiert in lipid rafts mit dem Signalmolekül Rac1 und aktiviert es (Tkachenko et al., 2004). Die Anreicherung von Syndecan in lipid rafts erfolgt erst nach der vorangehenden Bindung bzw. Aggregation durch den physiologischen Ligand Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF-2), kann jedoch auch durch polyklonale anti-Syndecan Ak hervorgerufen werden (Tkachenko et al., 2004). Die Anreicherung von TM-Agrin in lipid rafts erfolgt somit analog zur Anreicherung von Syndecan in lipid rafts, und zwar erst nach vorangehender Aggregation mittels spezifischer polyklonaler Ak, welche die Funktion des jeweiligen physiologischen Liganden simulieren. Daher kann gefolgert werden, dass die Aggregation von TM-Agrin durch polyklonale Ak notwendig ist um TM-Agrin in lipid rafts zu verschieben. Weitere Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass die Aggregation von TM-Agrin mit Hilfe von polyklonalen Ak nicht nur notwendig für die Verschiebung von TM-Agrin in lipid rafts ist, sondern zusätzlich noch die Interaktion mit weiteren in lipid raft befindlichen Molekülen fördert. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese kann das inaktive deletierte TM-AgrinFD6 Protein, welches nicht mehr dazu befähigt ist die Bildung von Ausläufern zu induzieren, nach Überexpression in HEK 293 Zellen ebenso in lipid rafts detektiert werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass lipid rafts ebenfalls notwendig für die durch Agrin induzierte Aggregation des AChR an der NMJ sind (Stetzkowski-Marden et al., 2006; Zhu et al., 2006). Hierbei handelt es sich allerdings um die lösliche NtA-Agrin Isoform die selber nicht mit lipid rafts assoziiert, sondern die Umverteilung von MuSK in lipid rafts induziert. Dagegen ist Agrin in Schwann Zellen (Iwase et al., 2005) und in T-Lymphozyten (Khan et al., 2001) selbst in lipid rafts lokalisiert. Konsistent mit den in dieser Arbeit erhaltenen Resultaten, handelt es sich zumindest bei dem in T-Lymphozyten gefundenem Agrin um die transmembrane Isoform (reviewed in (Bezakova und Ruegg, 2003)).

Die Desintegration von lipid rafts in RGC, entweder durch Verminderung der Glykosphingolipid Konzentration mit PDMP oder durch die akute Entfernung von Cholesterol aus der Zellmembran mittels methyl- β -Cyclodextrin inhibiert die Bildung von Ausläufern trotz anschließender Aktivierung von TM-Agrin mit anti-Agrin spezifischen Ak. Dieses Ergebnis liefert somit ein indirektes Indiz dafür, dass intakte lipid rafts für die durch

TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern unbedingt notwendig sind. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte eine Kolokalisation von TM-Agrin mit dem lipid raft Marker GM1 gezeigt werden. Aufgrund aller oben beschriebenen Ergebnisse ist deshalb davon auszugehen, dass lipid rafts als Signalplattform für TM-Agrin dienen. Innerhalb von lipid rafts kann TM-Agrin dann mit Molekülen interagieren, die das Signal zur Bildung Filopodien-ähnlicher Ausläufer durch die Zellmembran weiterleiten. Übereinstimmend mit dieser Hypothese konnte bereits gezeigt werden, dass für die Reggie-1 induzierte Bildung Filopodien-ähnlicher Ausläufer in verschiedenen Endothelzellen aber auch anderen Zelllinien lipid rafts unentbehrlich sind. Reggie-1 assoziiert ebenso wie TM-Agrin mit lipid rafts und interagiert dort mit weiteren bis dato nicht identifizierten Molekülen (Neumann-Giesen et al., 2004; Neumann-Giesen et al., 2007).

Für die TM-Agrin-abhängige Bildung von Ausläufern muss eine Reorganisation des Aktin Zytoskeletts stattfinden. Ein initialer Schritt, der notwendig für die Reorganisation des Aktin Zytoskeletts und die daraus resultierende Bildung von Ausläufern ist, ist, wie bereits zuvor erwähnt, die Anreicherung von TM-Agrin in lipid rafts. Ein nahezu identischer Bildungsmechanismus von Aktin-haltigen Ausläufern, allerdings auf Wachstumskegeln auswachsender Neuriten, wurde bereits bei der Rezeptor Tyrosin Kinase Pyk untersucht. In lipid rafts angereichertes Pyk2 bildet einen Komplex mit dem Adaptorprotein Cbl und veranlasst infolgedessen die Reorganisation des Aktin Zytoskeletts und somit die Bildung von Ausläufern (Haglund et al., 2004).

Die Behandlung bereits gebildeter Ausläufer mit methyl- β -Cyclodextrin geben einen Hinweis darauf, dass lipid rafts nicht nur für die Bildung, sondern auch für die Aufrechterhaltung bereits gebildeter Ausläufer notwendig sind. Daher scheint ein ständiger Informationsfluss vermittelt durch lipid raft assoziierte Proteine für die Reorganisation des Aktin Zytoskeletts und der daraus resultierenden Bildung von Ausläufern, aber auch für die Aufrechterhaltung zuvor gebildeter Ausläufer, unerlässlich.

6.3 Wie induziert TM-Agrin die Phosphorylierung signalweiterleitender Proteine?

TM-Agrin induziert nach Anreicherung und Aggregation in lipid rafts die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Fyn, der 44/42 MAPK und einem weiteren an Tyrosinresten phosphoryliertem Protein, welches jedoch nicht näher charakterisiert werden konnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Blockierung der Phosphorylierung von Fyn durch PP1 und der 44/42 MAPK durch PD98059 in einer signifikanten Reduktion

der Bildung TM-Agrin-induzierter Ausläufer resultiert. Die reversible Phosphorylierung ist im Allgemeinen ein wichtiger Mechanismus zur Steuerung von Signaltransduktionswegen (Cohen, 2000). Wie aber vermittelt TM-Agrin die Phosphorylierung der oben genannten Signalmoleküle und daraus resultierend die Bildung von Ausläufern? Fyn ist in unterschiedlichen Spezies und Geweben in lipid rafts lokalisiert (Harder et al., 1998; Hering et al., 2003; Shenoy-Scaria et al., 1994; Wolven et al., 1997) und konnte auch in Ausläuferbildenden RGC und HEK 293 Zellen zusammen mit TM-Agrin in lipid rafts detektiert werden (Abb.5 und 6). Deshalb wäre es möglich, dass TM-Agrin aufgrund der räumlichen Nähe in lipid rafts direkt mit Fyn interagiert bzw. Fyn phosphoryliert. Das Fyn Protein besteht wie alle Src-Familie Kinasen aus sechs funktionellen Domänen (Thomas und Brugge, 1997). Die Src-Homologie Domäne drei (SH3) fungiert unter anderem als Protein-Protein-Bindedomäne, die spezifisch kurze Prolin-reiche Sequenzen erkennt und daran bindet. Die zentrale Erkennungssequenz der Prolin-reichen Sequenz ist PXXP (Rickles et al., 1995). Die intrazelluläre Region von TM-Agrin ist nur zu ca. 50 % innerhalb verschiedener Spezies, wie dem Mensch, der Ratte, der Maus und dem Huhn identisch und weist keine Homologien zu bekannten Proteinen auf. Dennoch findet sich in den oben genannten Spezies innerhalb der intrazellulären Region das Sequenzmotif PXXP. Ferner befindet sich in der intrazellulären Region von TM-Agrin eine Konsensussequenz für eine putative Tyrosin Phosphorylierungsstelle. Die Src-Homologie Domäne 2 (SH2) von Fyn bindet spezifisch an phosphorylierte Tyrosinreste anderer Proteine (Roskoski, Jr., 2004). Es ist deshalb durchaus möglich, dass TM-Agrin über die Tyrosin Phosphorylierungsstelle oder das Sequenzmotif PXXP innerhalb seiner intrazellulären Region an Fyn bindet. Gegen diese Hypothese spricht, dass die Deletion der gesamten intrazellulären Region von TM-Agrin keinen Einfluss auf die Bildung von Ausläufern hat (McCroskery et al., 2006). Wahrscheinlicher ist es, dass TM-Agrin als Korezeptor die Funktion von Rezeptoren in lipid rafts moduliert, die wiederum direkt mit Fyn interagieren.

CAR könnte dieser durch TM-Agrin modulierte Rezeptor sein. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung konnte sowohl biochemisch als auch immunozytochemisch und funktionell nachgewiesen werden, dass CAR in Ausläuferbildenden RGC und HEK 293 in lipid rafts angereichert ist. Konsistent mit diesen Ergebnissen wurde CAR bereits in COS-7 Zellen nach transienter Transfektion in lipid raft Fraktionen detektiert (Ashbourne Excoffon et al., 2003). Darüber hinaus enthält die intrazelluläre Region von CAR eine Tyrosinphosphorylierungsstelle (Cohen et al., 2001) sowie ein PXXP Sequenzmotif an die Fyn direkt binden könnte.

Das Fyn in der durch TM-Agrin induzierten Bildung von Ausläufern auf auswachsenden Axonen des ZNS eine wichtige Rolle spielt, wird insbesondere durch folgende in dieser Arbeit erhaltenen Resultate gestützt: Erstens, Fyn wird nach vorangehender Aggregation von TM-Agrin in lipid rafts TM-Agrin abhängig phosphoryliert, und zweitens, die Blockierung der Aktivität von Fyn führt zu einer verminderten Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer. Konsistent mit diesen Ergebnissen wird Fyn während der Entwicklung des ZNS von Gliazellen aber auch von auswachsenden Neuronen exprimiert (Bixby und Jhabvala, 1993). Ferner konnte bereits in anderen Systemen nachgewiesen werden, dass Fyn für Bildung von Ausläufern wichtig ist. Die Analyse von Kortex Kulturen Fyn defizienter Mäuse ergab, dass die Dendriten kortikaler Neurone deutlich weniger Ausläufer im Vergleich zu parallel kultivierten kortikalen Neuronen aus Wildtyp Mäusen ausbilden (Morita et al., 2006). Fyn spielt allerdings nicht nur in Neuronen, sondern auch in Kulturen primärer Oligodendrozyten eine wichtige Rolle bei der Bildung von Ausläufern (Klein et al., 2002). Wird in primären Oligodendrozyten die Interaktion zwischen in lipid rafts lokalisiertem Fyn und dem Zytoskelett Protein Tau durch Konkurrenz mit einer Tau Deletionsmutante gestört, kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl und Länge von Oligodendrozytenausläufern (Klein et al., 2002). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den in dieser Arbeit erhaltenen Resultaten die zeigen, dass Fyn auch in der TM-Agrin induzierten Bildung von Ausläufern eine entscheidende signalweiterleitende Rolle spielt.

Wie TM-Agrin die Phosphorylierung von Fyn und die daraus resultierende Bildung von Ausläufern induzieren könnte, wurde bereits in den vorherigen Abschnitten erläutert. Bei den Untersuchungen anti-Agrin Ak behandelter RGC konnte jedoch ausserdem festgestellt werden, dass weiterhin die 44/42 MAP Kinase TM-Agrin abhängig phosphoryliert und aktiviert wird und zudem notwendig für die Bildung von Ausläufern ist. Wie aber induziert TM-Agrin die Phosphorylierung der 44/42 MAPK und wie kommt es darauf folgend zur Bildung von Ausläufern? Konsistent mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen konnte bereits nachgewiesen werden, dass Agrin sowohl in RGC Kulturen (Kim et al., 2003), als auch in Kulturen hippocampaler (Karasewski und Ferreira, 2003) und kortikaler Neurone (Hilgenberg und Smith, 2004) die 44/42 MAPK aktiviert. Allerdings wurde bei diesen Untersuchungen rekombinantes NtA-Agrin verwendet, welches zu den kultivierten Neuronen hinzugegeben wurde, und nicht TM-Agrin. Es wäre daher möglich, dass NtA-Agrin als Ligand von TM-Agrin oder auch von CAR fungiert und dadurch die Signalkaskade, die in der Bildung von Ausläufern resultiert, induziert. Gegen diese Hypothese spricht, dass weder bei der Untersuchung der RGC Kulturen noch bei der Untersuchung der hippocampalen und

kortikalen Neurone eine vermehrte Bildung von axonalen Ausläufern beobachtet wurde (Hilgenberg und Smith, 2004; Karasewski und Ferreira, 2003; Kim et al., 2003), so dass angenommen werden muss, dass NtA-Agrin in Bezug auf die Bildung von Ausläufern nicht als Ligand von TM-Agrin oder CAR in Frage kommt. Interessanterweise sind jedoch bei der durch NtA-Agrin induzierten Signalkaskade in kortikalen Neuronen Src-Kinasen, zu denen wie bereits erwähnt Fyn gehört, für die Aktivierung der 44/42 MAPK notwendig (Hilgenberg und Smith, 2004). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit durch Verwendung unterschiedlicher Inhibitoren ebenfalls nachgewiesen werden, dass aktives Fyn notwendig für die Phosphorylierung der 44/42 MAPK ist. Dieses Resultat wird dadurch untermauert, dass die Aktivität von Fyn bereits fünf Minuten nach Aggregation von TM-Agrin stark hochreguliert wird, wohingegen die Phosphorylierung der MAPK erst nach 30 Minuten ihr Maximum erreicht hat. Daher bleibt festzuhalten, dass Fyn die 44/42 MAPK entweder direkt oder über weitere signalweiterleitende Proteine aktiviert.

In Übereinstimmung mit der Vermutung das Fyn direkt mit der 44/42 MAPK interagiert, konnte anfang der neunziger Jahre anhand von Koimmunopräzipitationsstudien festgestellt werden, dass Fyn über die „Unique“ Domäne an die MAPK bindet (Pleiman et al., 1993). Die „Unique“ Domäne ist zwischen den einzelnen Mitgliedern der Src-Kinase Familie unterschiedlich. Daher wird angenommen, dass diese Domäne mit Rezeptoren oder Proteinen interagiert, die spezifisch nur an ein bestimmtes Mitglied der Src-Familie Kinasen binden (Thomas und Brugge, 1997). Daher ist eine direkte Bindung von Fyn an die 44/42 MAPK auf jeden Fall möglich. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Fyn abhängige Phosphorylierung der 44/42 MAPK nicht direkt, sondern über weitere, dazwischen geschaltete Proteine induziert wird.

Ein weiteres Indiz, dass die TM-Agrin induzierte Ausläuferbildung über einen Signalweg verläuft bei dem zunächst Fyn und davon abhängig die 44/42 MAPK phosphoryliert wird, liefern Untersuchungsergebnisse von Kolkova et al., die zeigen konnten, dass die durch NCAM stimulierte Phosphorylierung von Fyn die direkte Phosphorylierung der MAPK nach sich zieht (Kolkova et al., 2000). Wie im Detail dieser durch TM-Agrin induzierte Mechanismus der Phosphorylierung von Fyn und der 44/42 MAPK abläuft müsste durch weitere Untersuchungen analysiert werden.

6.4 Kalzium und zyklisches Guanosinmonophosphat beeinflussen die TM-Agrin vermittelte Ausläuferbildung

Kalzium aus dem extrazellulären Raum spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer. Im Gegensatz dazu beeinflusst die PI3-Kinase die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer nicht, obwohl sie in Kooperation mit der MAPK in dissoziierten CA3/CA1 pyramidalen Neuronen die Bildung von Filopodien reguliert (Kumar et al., 2005). Weiterhin bindet die PI3-Kinase mit ihrer p85 Untereinheit an die SH3 Domäne von Fyn (Pleiman et al., 1993; Renzoni et al., 1996). Daher wäre es nicht abwegig gewesen, wenn die PI-3 Kinase auch eine Rolle bei der Bildung von Ausläufern z.B. durch Interaktion mit Fyn und/oder der MAPK gehabt hätte.

Kalzium spielt nicht nur eine Schlüsselrolle bei der axonalen Wegfindung (Ming et al., 1999; Nishiyama et al., 2003), sondern ist überdies absolut notwendig für die Bildung, das Wachstum und die Stabilität von dendritischen Dornen und Filopodien, sowie dendritischen Dornenvorläufern, z.B. in Schnittkulturen von hippocampalen Ratten Neuronen (Engert und Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999). Die Bildung von neuen Filopodien, sowie von dendritischen Dornen und von Dornenvorläufer wird durch lokal erhöhte Kalziumkonzentrationen, welche die Dynamik des Aktin Zytoskeletts beeinflussen, hervorgerufen (Fischer et al., 1998; Richards et al., 2004). Die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer ist ebenso wie die Bildung der dendritischen Dornen abhängig von der Reorganisation des Aktin Zytoskeletts und von Kalzium. Daher kann man schlussfolgern, dass Kalzium aus dem extrazellulären Raum wichtig für die Reorganisation des Aktin Zytoskeletts und somit die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufern ist.

Es gibt im Wesentlichen zwei Zielmoleküle die durch Kalzium beeinflusst werden, zum einen die Kalzium/Calmodulin abhängige Protein Kinase (CaMK) und zum anderen die MAP-Kinase (Konur und Ghosh, 2005). Da die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern, wie bereits erwähnt, unter anderem von der 44/42 MAPK abhängig ist, liegt die Vermutung nahe, dass Kalzium die Aktivität der 44/42 MAPK moduliert. Für diese Hypothese spricht z.B., dass in kortikalen Neuronen die MAPK das Kalzium abhängige Wachstum von Dendriten reguliert (Redmond et al., 2002). In CA3/CA1 pyramidalen Neuronen vermittelt Kalzium die Phosphorylierung der MAPK, was die Bildung aktinhaltiger Filopodien zur Folge hat (Wu et al., 2001). Daher ist es durchaus möglich, dass auch in TM-Agrin induzierten Ausläufern Kalzium die MAPK aktiviert. Einen direkten Hinweis, dass Agrin über Kalzium die Aktivität der MAPK beeinflusst, liefern Untersuchungsergebnisse aus dem Labor von Martin Smith und Kollegen, die zeigen konnten, dass aus intrazellulären

Kalziumspeichern freigesetztes Kalzium die Aktivität der CaMKII sowie der MAPK in kortikalen Neuronen reguliert, was in der vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors *c-fos* resultiert (Hilgenberg und Smith, 2004; Hilgenberg et al., 1999). Obwohl es sich bei diesen Untersuchungen um NtA-Agrin und nicht um TM-Agrin handelt, ist es dennoch möglich, dass, vor allem aufgrund der großen strukturellen Übereinstimmungen der beiden Isoformen (vgl. Abb.1), die TM-Agrin induzierte Signalkaskade über einen ähnlichen Mechanismus verläuft wie die durch NtA-Agrin induzierte Signalkaskade in kortikalen Neuronen. Möglich wäre es allerdings auch, dass NtA-Agrin an CAR bindet und es somit zu einer *trans*-Aktivierung kommt. Nichts desto trotz ist eine Aktivierung der 44/42 MAPK durch Kalzium in Ausläuferbildenden Zellen nicht auszuschliessen.

Nun stellt sich allerdings die Frage durch welchen Mechanismus die Kalzium Konzentration in Ausläuferbildenden Zellen beeinflusst wird. Eine Möglichkeit wäre, dass Fyn die Synthese von cGMP initiiert, welches darauf hin den Einfluss von Kalzium aus dem extrazellulären Raum beeinflusst. Konsistent mit dieser Hypothese wurde erst kürzlich festgestellt, dass die β -1-Untereinheit der sGC („soluble guanylyl-cyclase“), welche die Umsetzung von GTP zu cGMP veranlasst, an die SH2 Domäne von Fyn bindet und dadurch aktiviert wird (Meurer et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Kalziumströme nicht durch cGMP beeinflusst werden, sondern dass umgekehrt die NO- und sGC-abhängige Synthese von cGMP, wie bereits von Yao beschrieben (Yao, 2007), durch Kalziumströme initiiert wird. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen kann nicht sichergestellt werden, ob eine der beiden angestellten Vermutungen zutrifft oder ob es sich um einen gänzlich anderen Mechanismus handelt. Dies müsste gegebenenfalls durch weitere Experimente genauer analysiert werden.

cGMP dient auf alle Fälle in vielen unterschiedlichen Zellen als Botenstoff und reguliert mehrere Zielproteine (Hofmann et al., 2000; Lucas et al., 2000). Speziell im ZNS wird cGMP zumeist von Stickstoffmonoxid (NO) und der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch Umsetzung von GTP zu cGMP erzeugt (Gibson und Garbers, 2000) und durch Phosphodiesterasen abgebaut. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Zugabe des cGMP spezifischen Inhibitors Rp-8-CPT-cGMPS zu RGC Kulturen zu einer stark reduzierten Bildung TM-Agrin-abhängiger Ausläufer führt. Darüber hinaus konnte zudem gezeigt werden, dass die Inkubation von RGC, ausschliesslich mit dem zellpermeablen cGMP-Analogon db-cGMP, konzentrationsabhängig in einer vermehrten Bildung von Ausläufern entlang des gesamten Axonschafts resultiert. Konsistent mit Ergebnissen die aufzeigen, dass cGMP die Bildung von TM-Agrin induzierten Filopodien-ähnlicher Ausläufer reguliert,

konnte bereits bei der Analyse von B5 Neuronen der Süßwasserschnecke *Helisoma trivolvis* nachgewiesen werden, dass cGMP durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration sowohl die Anzahl als auch die Länge von Filopoden beeinflusst. Entscheidend für die Synthese von cGMP ist die zuvor aktivierte sGC, von der angenommen wird, dass sie auch in der TM-Agrin induzierten cGMP abhängigen Signalkaskade wichtig für die cGMP Synthese sein könnte (Van Wagenen und Rehder, 1999; Van Wagenen und Rehder, 2001). Übereinstimmend mit der Hypothese, dass sGC die Synthese von cGMP während der TM-Agrin induzierten Signalkaskade veranlasst, vermittelt NCAM ebenso über die sGC die Umwandlung von GTP zu cGMP in dopaminergen und hippocampalen Neuronen aus der Ratte (Ditlevsen et al., 2007). In NG108-15 Zellen resultiert die Inkubation mit db-cGMP in einer verstärkten Bildung dendritischer Filopodien, die zudem Wachstumskegelähnliche Strukturen an ihren Spitzen ausbilden (Gendron et al., 2002). Übereinstimmend mit diesem Ergebnis bilden sich ebenfalls an den Spitzen TM-Agrin induzierte Filopodien-ähnlicher Ausläufer auf RGC Wachstumskegel aus (Annies et al., 2006) und ausserdem konnte nachgewiesen werden, dass db-cGMP die Bildung von Filopodien-ähnlichen Ausläufern de novo induziert.

Aufgrund der Feststellung, dass db-cGMP die Bildung von Ausläufern auf RGC de novo induzieren kann, musste mittels der Verwendung von db-cGMP zusammen mit anti-Agrin AK ausgeschlossen werden, dass es sich bei der TM-Agrin- und der cGMP-abhängigen Ausläuferbildung in RGC um zwei unterschiedliche Signalkaskaden handelt, die jedoch beide den gleichen Effekt verursachen. Es wurde allerdings kein additiver Effekt bei den untersuchten Kulturen beobachtet, was die Vermutung zulässt, dass cGMP eine Funktion als Botenstoff in der TM-Agrin-vermittelten Ausläuferbildung einnimmt. Weshalb mit db-cGMP inkubierte RGC Kulturen im Durchschnitt deutlich weniger Ausläufer bilden als anti-Agrin Ak behandelte RGC ist nicht geklärt. Eine Hypothese ist, dass cGMP nicht ausschliesslich für die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer, sondern viel mehr für die Stabilität bereits gebildeter Ausläufer eine entscheidende Rolle spielt. Diese Hypothese wird durch andere Untersuchungsergebnisse unterstützt, die zeigen, dass in kultivierten RGC aus der Ratte cGMP ausschliesslich für die Stabilität von Filopodien, nicht aber für deren Bildung notwendig ist (Cheung et al., 2000). Sicher ist auf alle Fälle, dass cGMP für die TM-Agrin abhängige Signalkaskade in Ausläuferbildenden Zellen notwendig ist.

Im Gegensatz zu cGMP ist cAMP nicht wichtig für die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern, obwohl cAMP z.B. in ausdifferenzierten Neuronen aus dem Hippocampus die BDNF kontrollierte TrkB Phosphorylierung und daraus resultierend die Bildung

aktinhaltiger dendritischer Dornen induziert (Ji et al., 2005). Die Behandlung kultivierter RGC mit dem cAMP spezifischen Inhibitor Rp-cAMPS führte allerdings nicht zur Reduktion TM-Agrin induzierter Ausläufer. Übereinstimmend hat die Inkubation mit dem cAMP Analogon db-cAMP auch nicht die de novo Bildung von Ausläufern zur Folge. Daher erscheint die Bildung von Ausläufern und die mögliche Rolle während der Stabilisierung bereits gebildeter Ausläufer spezifisch cGMP abhängig und nicht allgemein von zyklischen Nukleotiden beeinflussbar zu sein. Zusätzlich ist festzuhalten, dass offensichtlich nicht alle Ausläufer auf die gleiche Art und Weise gebildet werden.

6.5 Das Transmembranprotein CAR interagiert mit TM-Agrin und reguliert die Bildung von Ausläufern

Die TM-Agrin abhängige Signalkaskade zur Bildung von Ausläufern kann in RGC durch Inkubation mit anti-Agrin spezifischen polyklonalen Ak oder in nicht-neuronalen Zellen wie z.B. HEK 293 Zellen durch Überexpression aktiviert werden (Annie et al., 2006). Die Aktivierung von TM-Agrin wird somit auf nicht-physiologische Art und Weise erzeugt, wohingegen die daraus resultierende Reorganisation des Aktin Zytoskeletts und anschließende Bildung Filopodien-ähnlicher Ausläufer ein physiologisches Ereignis darstellt. Deshalb stellt sich die Frage welche(r) physiologische(n) Faktor(en) TM-Agrin aktivieren und daraus resultierend die Bildung von Ausläufern induzieren?

Eine Möglichkeit wäre, dass TM-Agrin vermittelt durch Bindung eines extrazellulären Liganden multimerisiert wird. Einige Untersuchungen weisen darauf hin, dass molekulare Signalstoffe wie Semaphorin-3a, Wnt-7a und FGF-2 die Bildung aktinhaltiger Ausläufer beeinflussen (Bagnard et al., 1998; Dent et al., 2004; Hall et al., 2000). Die lokale Zugabe z.B. von FGF-2 zu embryonalen pyramidalen Neuronen führt zu einer drastischen Zunahme axonaler Verzweigungen (Szebenyi et al., 2001), die morphologisch den TM-Agrin induzierten Ausläufern ähneln. Ende der neunziger Jahre konnte gezeigt werden, dass FGF-2 zudem an die Heparansulfatseitenketten von Agrin bindet (Cotman et al., 1999b). Daher lag zunächst die Vermutung nahe, dass FGF-2 unter Umständen der extrazelluläre Ligand ist, welcher TM-Agrin aggregiert und dadurch die nachfolgende Signalkaskade aktiviert. Allerdings gegen eine Rolle von FGF-2 sprechen erst kürzlich erhaltene Untersuchungsergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe die zeigen, dass die Zytoskelett reorganisierende Region innerhalb von TM-Agrin nicht die Heparansulfatseitenketten sondern die siebte Follistatin-ähnliche Domäne ist (Porten et al., Manuskript in Vorbereitung). An diese Domäne ist keine Bindung von FGF-2 beschrieben worden. Deshalb ist es

wahrscheinlicher, dass der physiologische Ligand von TM-Agrin an das Protein Rückgrat und nicht an die Heparansulfatseitenketten bindet. Ausserdem resultiert eine Inkubation von RGC über verschiedene Zeiträume mit unterschiedlichen Konzentrationen an FGF-2 nicht in der Bildung von Ausläufern (R. Ramseger, unveröffentlichte Beobachtungen), was den Schluss zulässt, dass FGF-2 keine Rolle bei der TM-Agrin induzierten Bildung von Ausläufern spielt.

Ein weiterer Kandidat für die Bindung an TM-Agrin wäre Wnt-7a. Die Zugabe von löslichem Wnt-7a zu Moosfasern aus dem Cerebrellum führt zur einer vermehrten Bildung von Ausläufern die zudem, konsistent mit TM-Agrin induzierten Ausläufern, ganz ähnlich zum Verhalten nach anti-Agrin Ak Behandlung, vergrößerte Wachstumskegel ausbilden (Annie et al., 2006; Hall et al., 2000). Daher wäre es durchaus möglich das Wnt-7a und TM-Agrin miteinander interagieren, was schlussendlich in der Bildung von Ausläufern resultiert. Diese Hypothese müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Einige Untersuchungsergebnisse führten zu der Hypothese, dass HSPG allgemein als Korezeptoren fungieren indem sie lösliche Proteine binden und dadurch deren Konzentration an der Plasmamembran erhöhen was die Aktivierung oder Inhibierung von nahegelegenen Rezeptoren zur Folge hat (Hall et al., 2000; Julien et al., 2007; Mostafavi-Pour et al., 2003). Übereinstimmend mit dieser Hypothese fungiert das Transmembranprotein Syndecan, welches ebenso zur Familie der HSPG gehört wie TM-Agrin, nachweislich als Korezeptor (Carey, 1997). Syndecane werden entwicklungsabhängig in vielen unterschiedlichen Zelltypen exprimiert. Insgesamt gibt es vier verschiedene Syndecane (Syndecan 1 – 4; (Bernfield et al., 1993; Kim et al., 1994). Obwohl die Funktion der verschiedenen Syndecane bis dato nicht im Detail aufgeklärt ist, wird angenommen, dass sie unter anderem eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Zellen spielen. Konsistent mit der durch TM-Agrin induzierten Bildung Aktinhaltiger Ausläufer kann ebenfalls Syndecan-2 die Bildung aktinhaltiger Ausläufer, abhängig von Cdc42, in COS-1 Zellen induzieren (Granes et al., 1999). Ferner konnte gezeigt werden, dass Syndecan-2 notwendig für die Bildung von Ausläufern auf Dendriten von kultivierten hippocampalen Neuronen ist. Im Gegensatz zur Bildung der durch TM-Agrin induzierten Ausläufer (Annie et al., 2006) ist für die Bildung Syndecan-2 induzierter Ausläufer die Protein Kinase A (PKA; (Lin et al., 2007) erforderlich. Die Multimerisierung einzelner Syndecane spielt analog zu der Multimerisierung von TM-Agrin eine wichtige Rolle. Syndecan-3 z.B. wird ebenso wie TM-Agrin multimerisiert. Allerdings sind für die Multimerisierung von Syndecan-3 zwei Glycine innerhalb der Transmembrandomäne und ein konservierter Bereich in der extrazellulär lokalisierten Region notwendig, wohingegen bei TM-Agrin die Transmembrandomäne keine Rolle spielt (Asundi

und Carey, 1995). An Syndecane binden viele unterschiedliche Liganden wie z.B. Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrix Moleküle, Zell-Zell Adhäsionsmoleküle, Enzyme und noch weitere Proteine. Die Spezifität der Bindung ist allerdings gering, weshalb, wie bereits oben erwähnt, im Allgemeinen vermutet wird, dass Syndecane nicht als Signaltransduzierende Rezeptoren, sondern vielmehr als Ligandenakkumulierende Korezeptoren fungieren (Carey, 1997). TM-Agrin wird ebenfalls durch Multimerisierung aktiviert. Ausserdem erscheint eine Funktion von TM-Agrin als Korezeptor alleinig aufgrund der Tatsache, dass die intrazelluläre Region von TM-Agrin nicht notwendig für die Bildung von Ausläufern ist durchaus möglich. Aufgrund dessen könnte es sich um einen generellen Aktivierungsmechanismus transmembraner HSPG handeln.

Die $\alpha 3$ Untereinheit der $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$ ATPase (NKA) bindet an den C-terminalen Bereich von Agrin und konnte erst kürzlich als ein neuronaler Rezeptor von Agrin identifiziert werden. Die Bindung von Agrin an die $\alpha 3$ Untereinheit inhibiert die Aktivität der NKA was zur Depolarisation der Zelle und somit zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt (Hilgenberg et al., 2006). Die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer ist wie bereits zuvor erwähnt ebenfalls Kalzium abhängig (Annie et al., 2006). Daher stellt sich die Frage ob die NKA möglicherweise als Rezeptor für die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern fungiert. Wie bereits zuvor erwähnt bindet die $\alpha 3$ Untereinheit der NKA an den C-terminalen Bereich von Agrin. Da jedoch der C-terminale Bereich von TM-Agrin keinen Einfluss auf die Bildung von Ausläufern hat, sondern die im N-terminalen Bereich des Protein Rückgrats gelegenen siebte Follistatin-ähnliche Domäne ist es unwahrscheinlich, dass die NKA als Rezeptor für die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern fungiert.

Ein weiterer Kandidat, der zusammen mit TM-Agrin die Ausläufer induzieren könnte wäre CAR. Koimmunopräzipitationsstudien sowie Kosedimentationsstudien (F.G. Rathjen, unveröffentlichte Beobachtungen) zeigen, dass TM-Agrin im Hühnergehirn während der Phase des aktiven axonalen Wachstums an CAR bindet. CAR ist ein Typ I Transmembranrezeptor, der neben Coxsackieviren der Gruppe B und nahezu allen Adenoviren, zudem unterschiedliche im Organismus vorkommende Proteine wie z.B. IgGs und IgMs (Carson und Chapman, 2001), sowie das multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) (Coyne et al., 2004) und das Ligand-of-Numb Protein-X2 (LNX2) (Mirza et al., 2005) bindet. Das tatsächliche Molekulargewicht von CAR beträgt etwa 46 kDa. Der Unterschied von berechnetem (39 kDa) zu tatsächlichem Molekulargewicht resultiert vermutlich aus der N-verknüpften Glykosylierung an zwei Positionen innerhalb des Proteins (Honda et al., 2000).

CAR gehört zur evolutionär konservierten Familie der IgG Moleküle, genauer zur Unterfamilie der CTX-Moleküle wie z.B. das Endothezellen selektives Adhäsionsmoleküle (ESAM) und das Cocksackie-Adenovirus Rezeptor-ähnliches Membranprotein (CLMP; (Bergelson et al., 1997; Du et al., 1999)). Die am Besten untersuchte Funktion von CAR ist die eines Adhäsionsmoleküls, welches durch homophile Interaktion die Aggregation von Zellen unterstützt (Honda et al., 2000; Okegawa et al., 2000). Konsistent mit den in dieser Arbeit gemachten Koimmunopräzipitationsstudien wurde Ende der Neunziger Jahre festgestellt, dass CAR auch während der Entwicklung des ZNS von nahezu allen neuronalen Zellen exprimiert wird (Honda et al., 2000; Johansson et al., 1999). Die Vermutung das CAR wichtig für die TM-Agrin vermittelte Signalkaskade sein könnte, wurde zunächst durch Kofärbungen auf kultivierten Ausläuferbildenden RGC bestätigt. CAR und TM-Agrin sind zumindest teilweise auf den Ausläufern der RGC aber auch auf dem Axonschaft kolokalisiert. Anhand der Analyse detergenzienunlöslicher Zellextrakte aus RGC konnte zudem gezeigt werden, dass CAR ebenso wie TM-Agrin in lipid rafts lokalisiert ist. Lipid rafts dienen als Signalplattform in der sich Rezeptoren und signalweiterleitende Moleküle konzentrieren. Daher ist es möglich, dass TM-Agrin in lipid rafts an CAR bindet, und dass dadurch und von dort aus die TM-Agrin vermittelte Signalkaskade initiiert wird (siehe Abschnitt 6.3). Die Überexpression von CAR cDNA führt sowohl in neuronalen Zellen als auch in nicht-neuronalen Zellen wie z.B. HEK 293 und CHO zur Entstehung vieler Ausläufer. Zumindest die Quantifizierung der Ausläuferanzahl CAR überexprimierender neuronaler Zellen zeigt keinen signifikanten Unterschied zu TM-Agrin überexprimierenden neuronalen Zellen. Im Gegensatz dazu bilden nicht-neuronale Zellen, wie die HEK 293 Zelllinie nach Transfektion mit TM-Agrin cDNA im Mittel 15 primäre Ausläufer pro Zelle mehr als HEK 293 die mit CAR cDNA transfiziert werden. Übereinstimmend enthalten jedoch sowohl die Ausläufer CAR als auch TM-Agrin überexprimierender HEK 293 das Zytoskelett Element Aktin. Allerdings sind die Ausläufer TM-Agrin transfizierter Zellen anscheinend länger als die CAR transfizierter Zellen. Dies könnte einerseits an einer unterschiedlich starken Expression der beiden cDNAs in HEK 293 liegen, andererseits ist es aber auch möglich, dass eine vollständige Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade erst durch ein Zusammenspiel von TM-Agrin und CAR erreicht wird. Der beste Hinweis darauf, dass CAR die TM-Agrin vermittelte Signalkaskade direkt beeinflusst, resultiert aus der Beobachtung, dass spezifisch anti-CAR Fab Fragmente konzentrationsabhängig die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer inhibieren. Konsistent mit dieser Beobachtung kann ebenso die Agrin abhängige Aggregation des AChR an der NMJ durch Blockierung von CAR mittels der Zugabe anti-CAR Fab Fragmente zu Muskelkulturen

inhibiert werden (S. Kröger und F.G. Rathjen, unpublizierte Beobachtungen) Eine ganze Reihe von unterschiedlichen Resultaten aus verschiedenen Systemen weisen somit darauf hin, dass CAR mit TM-Agrin interagiert und dass diese Interaktion die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer entscheidend beeinflusst. Ob TM-Agrin als Ligandenakkumulierender Korezeptor für CAR fungiert oder umgekehrt CAR als Korezeptor für TM-Agrin fungiert bleibt jedoch Gegenstand zukünftiger Untersuchungen

6.6 Vergleich Agrin induzierter Signalkaskaden: Neuromuskuläre Endplatte versus Fortsatzbildung

Die Bildung, Aufrechterhaltung und Regeneration der NMJ wird durch NtA-Agrin induziert (McMahan, 1990), die Bildung von Ausläufern auf PNS und ZNS Axonen und Dendriten dagegen von TM-Agrin (Annie et al., 2006; McCroskery et al., 2006). Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von NtA- und TM-Agrin stellt sich jedoch die Frage, ob sich nicht auch die durch NtA- und TM-Agrin induzierten Signalwege ähneln. TM-Agrin ist auf auswachsenden Axonen des ZNS in lipid rafts angereichert und interagiert dort vermutlich mit dem Transmembranprotein CAR. Lipid rafts sind ebenso notwendig für die NtA-Agrin induzierte Aggregation des AChR, sowie die Phosphorylierung von MuSK und die Interaktion von Rapsyn mit dem AChR an der NMJ (Gautam et al., 1995). Das Matrixprotein NtA-Agrin ist an der NMJ natürlich nicht selbst in lipid rafts angereichert sondern beeinflusst die Verteilung von MuSK, von Rapsyn und die des AChR in lipid rafts (Zhu et al., 2006). Eine Bindung von CAR an NtA-Agrin an der NMJ konnte allerdings bis dato noch nicht nachgewiesen werden. Dennoch ist CAR an der NMJ lokalisiert, und die Blockierung von CAR mit anti-CAR Fab Fragmenten hat eine reduzierte Aggregation des AChR zur Folge (S. Kröger, und F.G. Rathjen, unpublizierte Beobachtungen). Daher bleibt festzuhalten, dass CAR sowohl Bestandteil der durch TM-Agrin als auch der durch NtA-Agrin induzierten Signalkaskade ist.

Die Differenzierung der Prä- und Postsynapse an der NMJ erfolgt durch die Bindung von Basalmembran assoziiertem NtA-Agrin an einen heteromeren Rezeptorkomplex an der Postsynapse (Glass et al., 1996), dessen signaltransduzierender Teil die Tyrosinkinase MuSK ist (Valenzuela et al., 1995). Die Bindung von NtA-Agrin an MuSK stimuliert die Assoziation von MuSK mit den nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen Abl1 und Abl2, was zur Phosphorylierung der beiden Kinasen und von MuSK führt. Abl1 und Abl2 sind nicht nur notwendig für die Phosphorylierung von MuSK, sondern auch für die Aggregation des AChR, denn die Überexpression dominant negativer Abl Kinasen in der C2C12 Myoblasten Zelllinie

resultiert in einer stark verminderten Aggregation des AChR (Finn et al., 2003). Das Abl1 und/oder Abl2 eine Rolle bei der durch TM-Agrin induzierten Bildung von Ausläufern spielen, wurde nicht untersucht, ist allerdings aufgrund der Auswertung der Phosphotyrosinblots wenig wahrscheinlich. Bei der Analyse dieser Blots konnte keine Hochregulierung von Abl1 oder Abl2, die bei etwa 145 kDA bandieren, detektiert werden.

Im Gegensatz dazu wird die Phosphorylierung von Fyn und der 44/42 MAPK TM-Agrin abhängig hoch reguliert. Ferner sind die 44/42 MAPK und Fyn notwendig für die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer. Konsistent mit einer Rolle von Fyn während der Bildung von Ausläufern resultiert die Inkubation von primären Myoblasten mit rekombinantem NtA-Agrin in einer Zunahme der Phosphorylierung allgemein Src-Kinasen (Mittaud et al., 2004). Phosphoryliertes Fyn jedoch moduliert die Autophosphorylierung von MuSK, beeinflusst aber nicht die Aggregation des AChR, wie die zuvor erwähnten Abl Kinasen, sondern ist erforderlich für die Aufrechterhaltung bereits gebildeter AChR Aggregate (Mittaud et al., 2004; Sadasivam et al., 2005). Für die MAPK hingegen ist bisher weder bei der Bildung, noch bei der Aufrechterhaltung, oder der Regeneration der NMJ eine Funktion gezeigt worden.

Die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer im ZNS ist ferner abhängig von Kalzium, cGMP und Cdc42 (Annies et al., 2006; McCroskery et al., 2006). Sowohl Kalzium (Megeath und Fallon, 1998), als auch cGMP (Jones und Werle, 2004) und Cdc42 (Weston et al., 1999) beeinflussen die Bildung der NMJ respektive die Aggregation des AChR. Pervanadat, ein Phosphataseinhibitor, und Staurosporin, ein Inhibitor der Protein Kinase A, können zwar die NtA-Agrin vermittelte Bildung der NMJ verhindern haben im Gegensatz dazu allerdings keinen Einfluss auf die TM-Agrin induzierte Bildung von Ausläufern (Annies et al., 2006). Daher bleibt festzuhalten, dass einige jedoch nicht alle Moleküle die bei der Bildung, Aufrechterhaltung und Regeneration der NMJ durch NtA-Agrin beeinflusst werden zudem eine Rolle bei der Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer im ZNS spielen. Deshalb handelt es sich bei den durch NtA- und TM-Agrin induzierten Signalwegen sicherlich nicht um die Gleichen, sondern sie weisen lediglich einige Parallelen auf.

6.7 Modell der TM-Agrin induzierten Signalkaskade

In Abbildung 26 sind die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit und die sich daraus ergebenden Hypothesen in einem schematischen Modell dargestellt. Innerhalb von sphingolipid- und cholesterolreichen lipid raft Domänen der Plasmamembran bindet, zuvor durch polyklonale anti-Agrin Ak bzw. einen physiologischen Liganden oder Überexpression,

aggregiertes TM-Agrin an den Transmembranrezeptor CAR. Dies bewirkt TM-Agrin auf bis dato ungeklärte Weise den Einstrom von Kalzium in das Zellinnere. Die erhöhte Kalziumkonzentration im Zytosol, resultierend aus extrazellulären Kalziumströmen, könnte die Umwandlung von GTP zu cGMP fördern. Eine weitere Möglichkeit, die jedoch in diesem Modell nicht dargestellt ist, wäre, dass Fyn die Synthese von cGMP stimuliert, welches seinerseits den Einstrom von Kalzium induziert. Gewiss ist allerdings, dass Fyn TM-Agrin-abhängig phosphoryliert und damit aktiviert wird was eventuell auch durch direkte Bindung an CAR erfolgen kann.

Die Phosphorylierung der 44/42 MAPK erfolgt stromabwärts von Fyn und die vorangehende Aktivierung von Fyn ist notwendig für die Aktivierung der 44/42 MAPK. Daher ist es durchaus möglich, dass Fyn über die Phosphorylierung von MEK (Mitogen aktivierte ERK aktivierende Kinase) die 44/42 MAPK aktiviert.

Die Schlüsselrolle der Rho Familie GTPase Cdc42 bezüglich der Reorganisation des Aktin Zytoskeletts und der daraus resultierenden Bildung von Ausläufern wurde bereits in unterschiedlichen Zelltypen verschiedener Spezies nachgewiesen (Kaverina et al., 2002; Meyer und Feldman, 2002). In der Arbeit von McCroskery et al. von 2006 konnte gezeigt werden, dass für die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer Cdc42 ebenfalls notwendig ist, denn die Phosphorylierung von Wildtyp Cdc42 wurde ausschliesslich nach Koexpression von TM-Agrin mit Wildtyp Cdc42 hochreguliert. Ausserdem wurde beobachtet, dass Wildtyp Cdc42 und TM-Agrin überexprimierende SH-SY5Y Zellen Ausläufer bilden, was im Einklang mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen, dass alle untersuchten Zelltypen nach TM-Agrin Überexpression Aktinhaltige Ausläufer bilden, steht.

Über welchen Signalweg TM-Agrin Cdc42 phosphoryliert und wie dadurch die Bildung von Ausläufern induziert wird, wurde nicht näher untersucht. Eine direkte Interaktion von TM-Agrin mit dem zytoplasmatischen Cdc42 kann jedoch aufgrund fehlender Bindungsstellen für Cdc42 ausgeschlossen werden. Ausserdem ist, wie bereits erwähnt, die intrazelluläre Region von TM-Agrin nicht für die Bildung von Ausläufer erforderlich, da die Ausläuferbildung durch Überexpression eines Deletionskonstruktes induziert werden kann, in dem die gesamte intrazelluläre Region fehlt. Es wäre allerdings möglich das Cdc42 mit der 44/42 MAPK interagiert, da bereits in verschiedenen Untersuchungen eine Interaktion von Cdc42 mit der MAPK gezeigt werden konnte (Chen et al., 2006; Frost et al., 1997; Szczur et al., 2006). In neutrophilen Granulozyten z.B. führt die indirekte Aktivierung der MAPK durch Cdc42 zur Ausbildung Podosomen-ähnlicher Fortsätze auf den Zellen (Szczur et al., 2006). Daher wäre es auf jeden Fall möglich, dass die 44/42 MAPK durch Cdc42 aktiviert wird. Nicht

ausgeschlossen werden kann allerdings, dass Cdc42 das Bindeglied zwischen der aktivierten 44/42 MAPK und dem Aktin Zytoskelett darstellt. Die genaue Abfolge der durch TM-Agrin induzierten Signalkaskade müsste durch weitere Untersuchungen entschlüsselt werden.

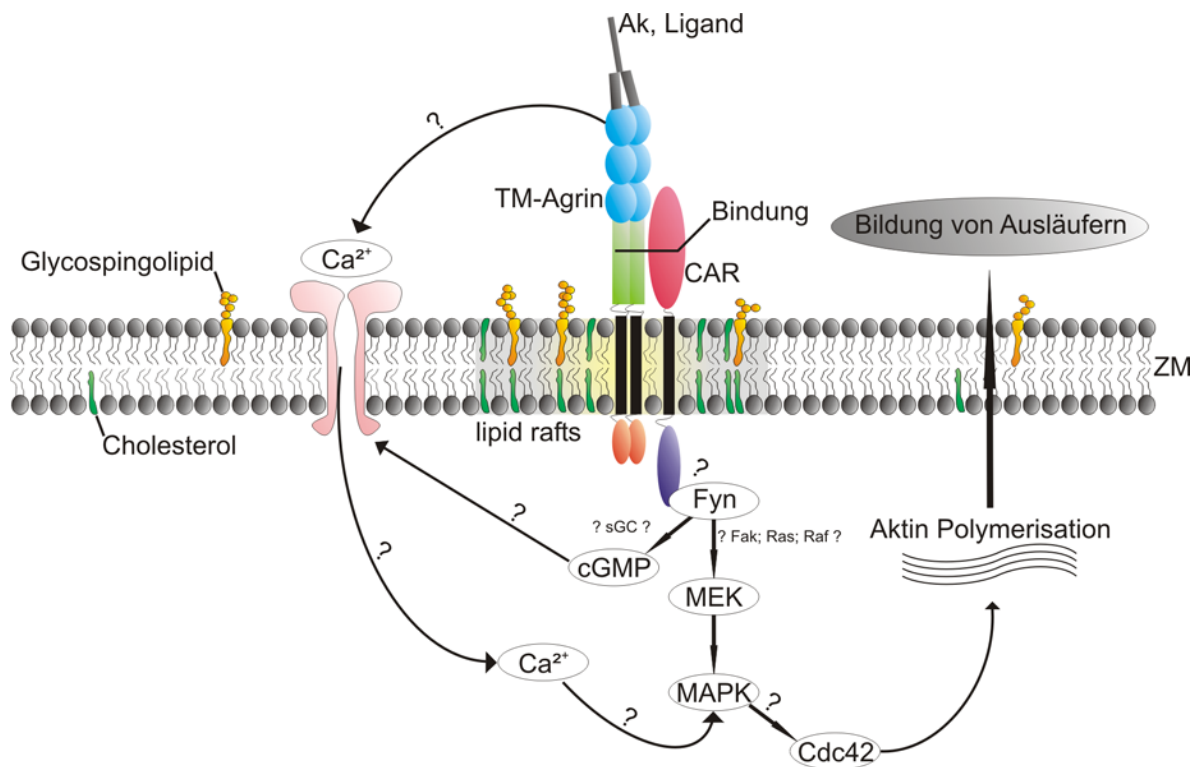


Abb.26: Schematische Zusammenfassung der TM-Agrin induzierten Bildung von Ausläufern. Nach Multimerisierung einzelner TM-Agrin Moleküle durch polyklonale Ak bzw. einen physiologischen Liganden bindet TM-Agrin innerhalb von Lipid Rafts an den Transmembranrezeptor CAR und veranlasst den Einstrom von Calcium in das Cytosol. Der Anstieg der intrazellulären Calcium Konzentration resultiert vermutlich in der Synthese von cGMP was seinerseits die Aktivität der MAPK beeinflusst. TM-Agrin gebundenes CAR könnte an Fyn binden, welches über MEK die MAPK aktiviert. Die somit durch Fyn und Calcium bzw. cGMP aktivierte MAPK interagiert wiederum mit Cdc 42. Die GTPase Cdc 42 beeinflusst die Polymerisation von Actin Filamenten und schlussendlich die Bildung actinhaltiger Ausläufer. Die mit Fragezeichen versehenen Zwischenschritte sind nicht detailliert untersucht und stellen daher hypothetische Annahmen dar.

6.8 Funktion Filopodien-ähnlicher Ausläufer *in vivo*

Das Aggregation von TM-Agrin durch Überexpression in HEK 293, PC12, COS-7 und CHO Zellen sowie in primäre Myoblasten und in tectalen Neuronen führt zur Bildung von Ausläufern, die morphologisch den Filopodien-ähnlichen Ausläufern ähneln, die auf RGC Axonen und hippocampalen Dendriten durch Aggregation mit polyklonalen Antikörpern induziert werden können. Die Frage stellt sich jedoch, welche physiologische Funktion die Bildung von Filopodien-ähnlichen Ausläufern *in vivo* haben könnte? Filopodien bzw. Filopodien-ähnliche Ausläufer sind von physiologischer Bedeutung bei der Wegfindung von Axonen, bei der Bildung axonaler und dendritischer Verzweigungen und bei der Synaptogenese (Chang und De, 2001; Dent et al., 2004; Niell et al., 2004; Nikonenko et al.,

2003). Die Bildung Filopodien-ähnlicher Ausläufer konnte bereits sowohl auf Axonen als auch auf Dendriten beobachtet werden (Chang und De, 2001; Jontes und Smith, 2000). Die Funktion von Ausläufern entlang des Axonschafts ist bis dato nicht geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass die Ausläufer dort für die Bildung neuer axonaler Verzweigungen und als Vorläufer von Präsynapsen fungieren (Dent et al., 2004; Nikonenko et al., 2003). Die dendritischen Ausläufer dienen als Ausgangspunkt für die Bildung von neuen Dornensynapsen (Yuste und Bonhoeffer, 2004). Die TM-Agrin induzierten Ausläufer sind in der frühen Phase ihrer Entwicklung hoch dynamisch und enthalten ebenso wie die dendritischen Ausläufer (Annies et al., 2006; Dailey und Smith, 1996; Fiala et al., 1998; Ziv und Smith, 1996) überwiegend Aktinfilamente (Fiala et al., 1998; Markham und Fifkova, 1986). Ausserdem ist die Bildung der dendritischen Ausläufer ebenso wie die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer Kalzium-abhängig (Annies et al., 2006; Korkotian und Segal, 1999). Die Bildung und Eliminierung sind in beiden Fällen beschrieben und die Halbwertszeit von dendritischen Ausläufern ist sehr ähnlich der Halbwertszeit der durch TM-Agrin induzierten Ausläufer. Folglich besteht die Möglichkeit, dass TM-Agrin in die Bildung von Synapsen zwischen Dendriten und Axonen involviert ist, indem es die Bildung von Filopodien-ähnlichen Ausläufern auf Dendriten, die sich danach zu Dornensynapsen entwickeln, initiiert. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist sowohl die Anzahl als auch die Transmission interneuroner Synapsen Agrin defizienter autonomer Ganglienzellen im Vergleich zu interneuronalen Synapsen von autonomen Wildtyp Ganglienzellen um 40 - 50% bzw. 56% reduziert (Gingras et al., 2007). Ferner ergab die Analyse von Agrin defizienten Mäusen, welche Agrin ausschliesslich in Motoneuronen aber in keinem anderen Gewebe exprimieren (*Tg/agrn*^{-/-}), dass die Anzahl an Synapsen im ZNS um ca. 30 % reduziert ist, wohingegen die Anzahl der Neurone nicht beeinflusst ist (Ksiazek et al., 2007). Ausserdem finden sich im Kortex von *Tg/agrn*^{-/-}Mäusen im Kontrast zu Wildtyp Mäusen deutlich kürzere Dendriten und die Dichte an dendritischen Spines ist stark reduziert. Darüberhinaus gibt es Hinweise, dass der MAPK Signalweg in *Tg/agrn*^{-/-}Mäusen gestört ist, da sowohl die Menge an mRNA sowie die Proteinmenge von regulatorischen Molekülen des MAPK Signalweges wie z.B. MKK7 in den *Tg/agrn*^{-/-}Mäusen stark reduziert ist (Ksiazek et al., 2007). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem in dieser Arbeit erhaltenen Resultat, dass die MAPK notwendig für die Bildung TM-Agrin induzierter Ausläufer ist und unterstützt zudem die Hypothese, dass es sich bei den TM-Agrin induzierten Ausläufern möglicherweise um die Vorläufer von Dornensynapsen handelt. Übereinstimmend mit den oben dargestellten Ergebnissen ist weiterhin, dass die Anzahl von Synapsen in kultivierten hippocampalen

Neuronen nach Behandlung mit Agrin antisense Oligonukleotiden reduziert ist (Böse et al., 2000). Die Filopodien-ähnlichen Ausläufer können somit im Organismus trotz ihrer strukturellen Verwandtschaft möglicherweise unterschiedliche physiologische Funktionen in verschiedenen Strukturen wie z.B. Axonen und Dendriten erfüllen. Die genaue Rolle der TM-Agrin induzierten Filopodien-ähnlichen Ausläufer *in vivo* ist bisher nicht aufgeklärt und müsste durch weitere Untersuchungen analysiert werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die Entdeckung einer Transmembranform des Proteoglykans Agrin führte zu der Hypothese, dass TM-Agrin ein Rezeptor oder Korezeptor mit signaltransduzierenden Eigenschaften sein könnte. Die durch Antikörper simulierte Ligandenbindung an TM-Agrin resultiert in der Bildung von zahlreichen Ausläufern sowohl auf ZNS als auch auf PNS Axonen und Dendriten und unterstützt diese Hypothese. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen führt die Überexpression von TM-Agrin in ZNS Neuronen ebenfalls zur Bildung von zahlreichen Ausläufern, wohingegen die Unterdrückung der TM-Agrin Expression durch siRNA die Anzahl der Ausläufer stark reduziert. Der Mechanismus der durch TM-Agrin induzierten Bildung von Ausläufern ist jedoch unbekannt. Ziel der Dissertation war es deshalb, die durch TM-Agrin induzierte Signalkaskade zu untersuchen.

Mit Hilfe von biochemischen, immunozytochemischen und pharmakologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich TM-Agrin auf auswachsenden Axonen und nach Überexpression in nicht-neuronalen Zellen in lipid rafts anreichert und das lipid rafts sowohl für die Bildung als auch für die Aufrechterhaltung der Ausläufer notwendig sind. Die durch polyklonale Antikörper induzierte Bildung von Ausläufern kann sowohl durch die Inhibierung der Src-Kinase Fyn, welche in lipid rafts lokalisiert ist, als auch der 44/42 MAPK gehemmt werden. Zudem führt die Aggregation von TM-Agrin durch polyklonale Antikörper zu einer erhöhten Aktivität der Fyn- und 44/42 MAP-Kinase. Im Gegensatz dazu hat eine Inhibierung der PI3-Kinase keine Auswirkungen auf die Bildung der Ausläufer. Der intrazelluläre, sekundäre Botenstoff cGMP, nicht aber cAMP, fördert die Bildung von Ausläufern. Die konzentrationsabhängige Blockierung des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (CAR) führt zu einer Hemmung der Ausläuferbildung. Ferner interagiert CAR im Zentralnervensystem während der Phase des aktiven axonalen Wachstums mit TM-Agrin und induziert nach Überexpression in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen die Bildung von Ausläufern. In der vorliegenden Arbeit konnten somit Teilabschnitte der durch TM-Agrin induzierten Signalkaskade entschlüsselt werden.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AChR	Acetylcholinrezeptor
APS	Ammoniumpersulfat
Ara C	Cytosin β -D-Arabino Furanosidhydrochlorid
AS	Amminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure-tetrakis-(acetoxymethyl)-ester
bp	Basenpaare
BDNF	„brain derived neurotrophic factor“
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Carboxy
C	Cystein
ca.	zirka
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaPO ₄	Kalziumphosphat
CAMK	Calcium/Calmodulin Kinase
CAR	Coxsackie-Adenovirus Rezeptor
CEE	Hühnchen Embryo Extrakt (chick embryo extract)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CREB	cAMP response element binding Protein
CTx	Cholera Toxin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
db-cAMP	dibutyryl zyklisches Adenosinmonophosphat
db-cGMP	dibutyryl zyklisches Guanosinmonophosphat
DG	Deckgläschen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimehtylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EpoR	Erythropoitin Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	Fragment a und b des Antikörpers (monovalent)
Fc	konstante Region eines Immunglobulins
FCS	fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
FGFR	FGF-Rezeptor
g	Gramm
G	globulär
G	Glycin
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Actin und Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

GDNF	„ <u>g</u> lia <u>c</u> ell <u>l</u> ine <u>d</u> erived <u>n</u> eurotrophic <u>f</u> actor”
GFR	“ <u>G</u> DNF <u>f</u> amily <u>r</u> eceptor”
GM 1	Gangliosid M 1
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (hour)
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hanks Balanced Salt
HB-GAM	Heparin-bindendes Wachstum-assoziiertes Molekül(<u>h</u> eparin- <u>b</u> inding <u>g</u> rowth- <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecule)
Hek	human embryonic kidney
HG	Hühnchen Gesamtgehirn
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
I-CAM	Intrazelluläres Zelladhäsionsmolekül (<u>i</u> ntracellular <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule)
Ig	Immunglobulin
IP	Immunopräzipitation
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
Ly	Lysat
ml	Milliliter
mm	Millimeter
min.	Minute
M	Molarität
mA	Milliampere
MAP-2	Mikrotubuli assoziiertes Protein-2 (<u>m</u> icrotubule <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein-2)
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase (<u>m</u> itogen <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase)
MCS	<u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite
MEM	<u>M</u> inimum <u>e</u> ssential <u>m</u> edium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<u>m</u> ain <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MuSK	Muskel spezifische Kinase (<u>M</u> uscle- <u>S</u> pecific- <u>K</u> inase)
mßC	<u>M</u> ethyl- <u>ß</u> - <u>C</u> yclodextrin
N	Amino
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül (<u>n</u> eural <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule)
NgCAM	Neuron Glia Zelladhäsionsmolekül (<u>n</u> euron <u>g</u> lia <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule)
NGF	Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor)
NKA	Natrium Kalium ATPase
nm	Nanometer
NMJ	neuromuskuläre Endplatte (neuromuscular junction)
NtA	aminoterminales Agrin

OD	Optische Dichte
Prä	Präimmun
prä-mRNA	Vorstufe der mRNA mit Exons und Introns
P/S	<u>P</u> enicillin/ <u>S</u> treptomycin
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDMP	(±)- <i>threo</i> -1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol hydrochloride
PFA	Paraformaldehyd
PI-3 Kinase	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
pLL	Poly-L-Lysine
PNS	peripheres Nervensystem
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RGC	retinale Ganglienzellen (<u>r</u> etinal <u>g</u> anglion <u>c</u> ells)
RNA	Ribonucleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEA	<u>S</u> ea urchin sperm protein <u>E</u> nterokinase, <u>A</u> grin
sek.	Sekunden
Ser	Serin
SH-Domäne	<u>S</u> rc- <u>H</u> omologie Domäne
SOC Medium	<u>s</u> uper <u>o</u> ptimal broth-Medium + Glucose
Src-Kinase	<u>S</u> arcoma viral oncogene homolog Kinase
Std	Stunden
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TBS	<u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethyl-methylen-diamin
Tet	Tetrazyklin
TfR	<u>T</u> ransferrin <u>R</u> ezeptor
Thr	Threonin
TM	Transmembran
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
TZR	T-Zellrezeptor
ÜN	Über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (<u>v</u> olume per <u>v</u> olume)
w/v	Gewicht pro Volumen (<u>w</u> eight per <u>v</u> olume)
GABA	γ -Aminobuttersäure
ZNS	Zentrales Nervensystem
° C	Grad Celsius
μ	Mikro
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
Δ	Delta
ε	Epsilon

9 LITERATURVERZEICHNIS

Alessi, D.R., A.Cuenda, P.Cohen, D.T.Dudley, and A.R.Saltiel. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270:27489-27494.

Annie, M., G.Bittcher, R.Ramseger, J.Loschinger, S.Woll, E.Porten, C.Abraham, M.A.Ruegg, and S.Kröger. 2006. Clustering transmembrane-agrin induces filopodia-like processes on axons and dendrites. *Mol. Cell Neurosci.* 31:515-524.

Annie, M. and S.Kröger. 2002. Isoform pattern and AChR aggregation activity of agrin expressed by embryonic chick retinal ganglion neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 20:525-535.

Antolik, C., D.H.Catino, A.M.O'Neill, W.G.Resneck, J.A.Ursitti, and R.J.Bloch. 2007. The actin binding domain of ACF7 binds directly to the tetratricopeptide repeat domains of rapsyn. *Neuroscience* 145:56-65.

Antolik, C., D.H.Catino, W.G.Resneck, and R.J.Bloch. 2006. The tetratricopeptide repeat domains of rapsyn bind directly to cytoplasmic sequences of the muscle-specific kinase. *Neuroscience* 141:87-100.

Ashbourne Excoffon, K.J., T.Moninger, and J.Zabner. 2003. The coxsackie B virus and adenovirus receptor resides in a distinct membrane microdomain. *J. Virol.* 77:2559-2567.

Asundi, V.K. and D.J.Carey. 1995. Self-association of N-syndecan (syndecan-3) core protein is mediated by a novel structural motif in the transmembrane domain and ectodomain flanking region. *J. Biol. Chem.* 270:26404-26410.

Bae, J.S., L.Yang, and A.R.Rezaie. 2007. Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104:2867-2872.

Bagnard, D., M.Lohrum, D.Uziel, A.W.Puschel, and J.Bolz. 1998. Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125:5043-5053.

Barber, A.J. and E.Lieth. 1997. Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier. *Dev. Dyn.* 208:62-74.

Barfod, E.T., A.L.Moore, M.W.Roe, and S.D.Lidofsky. 2007. Ca²⁺-activated IK1 Channels Associate with Lipid Rafts upon Cell Swelling and Mediate Volume Recovery. *J. Biol. Chem.* 282:8984-8993.

Bergelson, J.M., J.A.Cunningham, G.Droguett, E.A.Kurt-Jones, A.Krithivas, J.S.Hong, M.S.Horwitz, R.L.Crowell, and R.W.Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-1323.

Bernfield, M., M.T.Hinkes, and R.L.Gallo. 1993. Developmental expression of the syndecans: possible function and regulation. *Dev. Suppl* 205-212.

Bezakova, G. and M.A.Ruegg. 2003. New insights into the roles of agrin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:295-308.

Bixby, J.L., K.Baerwald-De la Torre, C.Wang, F.G.Rathjen, and M.A.Ruegg. 2002. A neuronal inhibitory domain in the N-terminal half of agrin. *J. Neurobiol.* 50:164-179.

Bixby, J.L. and P.Jhabvala. 1993. Tyrosine phosphorylation in early embryonic growth cones. *J. Neurosci.* 13:3421-3432.

Borges, L.S., Y.Lee, and M.Ferns. 2002. Dual role for calcium in agrin signaling and acetylcholine receptor clustering. *J. Neurobiol.* 50:69-79.

Bork, P. and L.Patthy. 1995. The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation. *Protein Science* 4:1421-1425.

Böse, C.M., D.Qiu, A.Bergamaschi, B.Gravante, M.Bossi, A.Villa, F.Rupp, and A.Malgaroli. 2000. Agrin controls synaptic differentiation in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 20:9086-9095.

Bouillon, M., F.Y.El, J.Girouard, H.Khalil, J.Thibodeau, and W.Mourad. 2003. Lipid raft-dependent and -independent signaling through HLA-DR molecules. *J. Biol. Chem.* 278:7099-7107.

Brown, D.A. and E.London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:111-136.

Brown, M.T. and J.A.Cooper. 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta* 1287:121-149.

Bruses, J.L., N.Chauvet, and U.Rutishauser. 2001. Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J. Neurosci.* 21:504-512.

Burgess, R.W., D.K.Dickman, L.Nunez, D.J.Glass, and J.R.Sanes. 2002. Mapping sites responsible for interactions of agrin with neurons. *J. Neurochem.* 83:271-284.

Burgess, R.W., W.C.Skarnes, and J.R.Sanes. 2000. Agrin isoforms with distinct amino termini: Differential expression, localization, and function. *J. Cell Biol.* 151:41-52.

Butchbach, M.E., G.Tian, H.Guo, and C.L.Lin. 2004. Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for excitatory amino acid transporter localization and function. *J. Biol. Chem.* 279:34388-34396.

- Butt, E., M.Eigenthaler, and H.G.Genieser. 1994. (Rp)-8-pCPT-cGMPS, a novel cGMP-dependent protein kinase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 269:265-268.
- Carey, D.J. 1997. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem. J.* 327 (Pt 1):1-16.
- Carson, S.D. and N.M.Chapman. 2001. Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) binds immunoglobulins. *Biochemistry* 40:14324-14329.
- Cavalli, A., M.Eghbali, T.Y.Minosyan, E.Stefani, and K.D.Philipson. 2007. Localization of sarcolemmal proteins to lipid rafts in the myocardium. *Cell Calcium*.
- Chang, S. and C.P.De. 2001. Glutamate regulates actin-based motility in axonal filopodia. *Nat. Neurosci.* 4:787-793.
- Chang, S., F.G.Rathjen, and J.A.Raper. 1990. Neurite outgrowth promoting activity of G4 and its inhibition by monoclonal antibodies. *J. Neurosci. Res.* 25:180-186.
- Charles, M.P., D.Adamski, B.Kholler, L.Pelletier, F.Berger, and D.Wion. 2003. Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by the bacterial nucleoside N6-methyldeoxyadenosine is mediated through adenosine A2a receptors and via cAMP and MAPK signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:795-800.
- Chen, C. and H.Okayama. 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.* 7:2745-2752.
- Chen, L., B.M.Necela, W.Su, M.Yanagisawa, P.Z.Anastasiadis, A.P.Fields, and E.A.Thompson. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes epithelial to mesenchymal transformation by Rho GTPase-dependent activation of ERK1/2. *J. Biol. Chem.* 281:24575-24587.
- Cheung, W.S., I.Bhan, and S.A.Lipton. 2000. Nitric oxide (NO.) stabilizes whereas nitrosonium (NO⁺) enhances filopodial outgrowth by rat retinal ganglion cells in vitro. *Brain Res.* 868:1-13.
- Cheusova, T., M.A.Khan, S.W.Schubert, A.C.Gavin, T.Buchou, G.Jacob, H.Sticht, J.Allende, B.Boldyreff, H.R.Brenner, and S.Hashemolhosseini. 2006. Casein kinase 2-dependent serine phosphorylation of MuSK regulates acetylcholine receptor aggregation at the neuromuscular junction. *Genes Dev.* 20:1800-1816.
- Cohen, C.J., J.Gaetz, T.Ohman, and J.M.Bergelson. 2001. Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting. *J. Biol. Chem.* 276:25392-25398.
- Cohen, M.W. and E.W.Godfrey. 1992. Early appearance of and neuronal contribution to agrin-like molecules at embryonic frog nerve-muscle synapses formed in culture. *J. Neurosci.* 12:2982-2992.

Cohen, N.A., W.E.Kaufmann, P.F.Worley, and F.Rupp. 1997. Expression of agrin in the developing and adult rat brain. *Neuroscience* 76:581-596.

Cohen, P. 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* 25:596-601.

Cornish, T., J.Chi, S.Johnson, Y.Lu, and J.T.Campanelli. 1999. Globular domains of agrin are functional units that collaborate to induce acetylcholine receptor clustering. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 8):1213-1223.

Cotman, S.L., W.Halfter, and G.J.Cole. 1999a. Evidence of a role for agrin in beta-amyloid (A beta) aggregation and persistence in Alzheimer's disease. *Mol. Biol. Cell* 10:348.

Cotman, S.L., W.Halfter, and G.J.Cole. 1999b. Identification of extracellular matrix ligands for the heparan sulfate proteoglycan agrin. *Exp. Cell Res.* 249:54-64.

Cowley, S., H.Paterson, P.Kemp, and C.J.Marshall. 1994. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77:841-852.

Coyne, C.B., T.Voelker, S.L.Pichla, and J.M.Bergelson. 2004. The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. *J. Biol. Chem.* 279:48079-48084.

Daggett, D.F., M.W.Cohen, D.Stone, K.Nikolics, H.Rauvala, and H.B.Peng. 1996. The role of an agrin-growth factor interaction in ACh receptor clustering. *Mol. Cell Neurosci.* 8:272-285.

Dailey, M.E. and S.J.Smith. 1996. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J. Neurosci.* 16:2983-2994.

DeChiara, T.M., D.C.Bowen, D.M.Valenzuela, M.V.Simmons, W.T.Poueymirou, S.Thomas, E.Kinetz, D.L.Compton, E.Rojas, J.S.Park, C.Smith, P.S.Distefano, D.J.Glass, S.J.Burden, and G.D.Yancopoulos. 1996. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85:501-512.

Dent, E.W., A.M.Barnes, F.Tang, and K.Kalil. 2004. Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton. *J. Neurosci.* 24:3002-3012.

Denzer, A.J., M.Gesemann, B.Schumacher, and M.A.Ruegg. 1995. An amino-terminal extension is required for the secretion of chick agrin and its binding to extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 131:1547-1560.

Denzer, A.J., T.Schulthess, C.Fauser, B.Schumacher, R.A.Kammerer, J.Engel, and M.A.Ruegg. 1998. Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1. *EMBO J.* 17:335-343.

Ditlevsen, D.K., L.B.Kohler, V.Berezin, and E.Bock. 2007. Cyclic guanosine monophosphate signalling pathway plays a role in neural cell adhesion molecule-mediated neurite outgrowth and survival. *J. Neurosci. Res.* 85:703-711.

Dorner, A.A., F.Wegmann, S.Butz, K.Wolburg-Buchholz, H.Wolburg, A.Mack, I.Nasdala, B.August, J.Westermann, F.G.Rathjen, and D.Vestweber. 2005. Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J. Cell Sci.* 118:3509-3521.

Du, P.L., M.Courtet, and I.Chretien. 1999. Duplication and MHC linkage of the CTX family of genes in *Xenopus* and in mammals. *Eur. J. Immunol.* 29:1729-1739.

Engert, F. and T.Bonhoeffer. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399:66-70.

Escher, P., E.Lacazette, M.Courtet, A.Blindenbacher, L.Landmann, G.Bezakova, K.C.Lloyd, U.Mueller, and H.R.Brenner. 2005. Synapses form in skeletal muscles lacking neuregulin receptors. *Science* 308:1920-1923.

Ferns, M.J., J.T.Campanelli, W.Hoch, R.H.Scheller, and Z.W.Hall. 1993. The ability of agrin to cluster AChRs depends on alternative splicing and on cell surface proteoglycans. *Neuron* 11:491-502.

Ferreira, A. 1999. Abnormal synapse formation in agrin-depleted hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* 112:4729-4738.

Fiala, J.C., M.Feinberg, V.Popov, and K.M.Harris. 1998. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 18:8900-8911.

Finn, A.J., G.Feng, and A.M.Pendergast. 2003. Postsynaptic requirement for Abl kinases in assembly of the neuromuscular junction. *Nat. Neurosci.* 6:717-723.

Fischer, M., S.Kaech, D.Knutti, and A.Matus. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20:847-854.

Frost, J.A., H.Steen, P.Shapiro, T.Lewis, N.Ahn, P.E.Shaw, and M.H.Cobb. 1997. Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *EMBO J.* 16:6426-6438.

Fuki, I.V., M.E.Meyer, and K.J.Williams. 2000. Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts. *Biochem. J.* 351 Pt 3:607-612.

Gautam, M., P.G.Noakes, L.Moscoso, F.Rupp, R.H.Scheller, J.P.Merlie, and J.R.Sanes. 1996. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 85:525-535.

- Gautam, M., P.G.Noakes, J.Mudd, M.Nichol, G.C.Chu, J.R.Sanes, and J.P.Merlie. 1995. Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice [see comments]. *Nature* 377:232-236.
- Gendron, L., F.Cote, M.D.Payet, and N.Gallo-Payet. 2002. Nitric oxide and cyclic GMP are involved in angiotensin II AT(2) receptor effects on neurite outgrowth in NG108-15 cells. *Neuroendocrinology* 75:70-81.
- Gesemann, M., V.Cavalli, A.J.Denzer, A.Brancaccio, B.Schumacher, and M.A.Ruegg. 1996. Alternative splicing of agrin alters its binding to heparin, dystroglycan, and the putative agrin receptor. *Neuron* 16:755-767.
- Gesemann, M., A.J.Denzer, and M.A.Ruegg. 1995. Acetylcholine receptor aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *J. Cell Biol.* 128:625-636.
- Ghosh, A. and M.E.Greenberg. 1995. Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* 15:89-103.
- Gibson, A.D. and D.L.Garbers. 2000. Guanylyl cyclases as a family of putative odorant receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 23:417-439.
- Gingras, J. and M.Ferns. 2001. Expression and localization of agrin during sympathetic synapse formation in vitro. *J. Neurobiol.* 48:228-242.
- Gingras, J., S.Rassadi, E.Cooper, and M.Ferns. 2007. Synaptic transmission is impaired at neuronal autonomic synapses in agrin-null mice. *Dev. Neurobiol.* 67:521-534.
- Glass, D.J., D.C.Bowen, T.N.Stitt, C.Radziejewski, J.Bruno, T.E.Ryan, D.R.Gies, S.Shah, K.Mattsson, S.J.Burden, P.S.Distefano, D.M.Valenzuela, T.M.DeChiara, and G.D.Yancopoulos. 1996. Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 85:513-523.
- Godfrey, E.W. 1991. Comparison of agrin-like proteins from the extracellular matrix of chicken kidney and muscle with neural agrin, a synapse organizing protein. *Exp. Cell Res.* 195:99-109.
- Godfrey, E.W., J.Roe, and R.D.Heathcote. 2000. Agrin fragments differentially induce ectopic aggregation of acetylcholine receptors in myotomal muscles of *Xenopus* embryos. *J. Neurobiol.* 44:436-445.
- Godfrey, E.W., R.E.Siebenlist, P.A.Wallskog, L.M.Walters, D.L.Bolender, and D.E.Yorde. 1988. Basal lamina components are concentrated in premyotome masses and at early acetylcholine receptor clusters in chick embryo hindlimb muscles. *Dev. Biol.* 130:471-486.
- Graham, F.L., J.Smiley, W.C.Russell, and R.Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36:59-74.

- Gramolini, A.O. and B.J.Jasmin. 1998. Molecular mechanisms and putative signalling events controlling utrophin expression in mammalian skeletal muscle fibres. *Neuromuscul. Disord.* 8:351-361.
- Granes, F., R.Garcia, R.P.Casaroli-Marano, S.Castel, N.Rocamora, M.Reina, J.M.Urena, and S.Vilaro. 1999. Syndecan-2 induces filopodia by active cdc42Hs. *Exp. Cell Res.* 248:439-456.
- Groffen, A.J., C.A.Buskens, T.H.van Kuppevelt, J.H.Veerkamp, L.A.Monnens, and L.P.van den Heuvel. 1998. Primary structure and high expression of human agrin in basement membranes of adult lung and kidney. *Eur. J. Biochem.* 254:123-128.
- Haglund, K., I.Ivankovic-Dikic, N.Shimokawa, G.D.Kruh, and I.Dikic. 2004. Recruitment of Pyk2 and Cbl to lipid rafts mediates signals important for actin reorganization in growing neurites. *J. Cell Sci.* 117:2557-2568.
- Halfter, W. 1993. A heparan sulfate proteoglycan in developing avian axonal tracts. *J. Neurosci.* 13:2863-2873.
- Halfter, W., D.F.Newgreen, J.Sauter, and U.Schwarz. 1983. Oriented axon outgrowth from avian embryonic retinæ in culture. *Dev. Biol.* 95:56-64.
- Halfter, W., W.Reckhaus, and S.Kröger. 1987. Nondirected axonal growth on basal lamina from avian embryonic neural retina. *J. Neurosci.* 7:3712-3722.
- Halfter, W., B.Schurer, J.Yip, L.Yip, G.Tsen, J.A.Lee, and G.J.Cole. 1997. Distribution and substrate properties of agrin, a heparan sulfate proteoglycan of developing axonal pathways. *J. Comp. Neurol.* 383:1-17.
- Hall, A.C., F.R.Lucas, and P.C.Salinas. 2000. Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 100:525-535.
- Hambusch, B., V.Grinevich, P.H.Seeburg, and M.K.Schwarz. 2005. γ -Protocadherins, presenilin-mediated release of C-terminal fragment promotes locus expression. *J. Biol. Chem.* 280:15888-15897.
- Hanke, J.H., J.P.Gardner, R.L.Dow, P.S.Changelian, W.H.Brissette, E.J.Weringer, B.A.Pollok, and P.A.Connelly. 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* 271:695-701.
- Harder, T., P.Scheiffele, P.Verkaide, and K.Simons. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* 141:929-942.
- Heldin, C.H. 1995. Dimerization of cell-surface receptors in signal-transduction. *Cell* 80:213-223.

- Herbst, R. and S.J.Burden. 2000. The juxtamembrane region of MuSK has a critical role in agrin-mediated signaling (vol 19, pg 67, 2000). *EMBO J.* 19:1167.
- Hering, H., C.C.Lin, and M.Sheng. 2003. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.* 23:3262-3271.
- Hilgenberg, L.G. and M.A.Smith. 2004. Agrin signaling in cortical neurons is mediated by a tyrosine kinase-dependent increase in intracellular Ca²⁺ that engages both CaMKII and MAPK signal pathways. *J. Neurobiol.* 61:289-300.
- Hilgenberg, L.G., H.Su, H.Gu, D.K.O'Dowd, and M.A.Smith. 2006. Alpha3Na⁺/K⁺-ATPase is a neuronal receptor for agrin. *Cell* 125:359-369.
- Hilgenberg, L.G.W., C.L.Hoover, and M.A.Smith. 1999. Evidence of an agrin receptor in cortical neurons. *J. Neurosci.* 19:7384-7393.
- Hill, C.S. and R.Treisman. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80:199-211.
- Hoch, W., J.T.Campanelli, S.Harrison, and R.H.Scheller. 1994. Structural domains of agrin required for clustering of nicotinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* 13:2814-2821.
- Hofmann, F., A.Ammendola, and J.Schlossmann. 2000. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 10):1671-1676.
- Honda, T., H.Saitoh, M.Masuko, T.Katagiri-Abe, K.Tominaga, I.Kozakai, K.Kobayashi, T.Kumanishi, Y.G.Watanabe, S.Odani, and R.Kuwano. 2000. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 77:19-28.
- Hooper, N.M. 1999. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol. Membr. Biol.* 16:145-156.
- Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-236.
- Inokuchi, J., I.Mason, and N.S.Radin. 1987. Antitumor activity via inhibition of glycosphingolipid biosynthesis. *Cancer Lett.* 38:23-30.
- Ivins, J.K., M.K.Parry, and D.A.Long. 2004. A novel cAMP-dependent pathway activates neuronal integrin function in retinal neurons. *J. Neurosci.* 24:1212-1216.
- Iwase, T., C.G.Jung, H.Bae, M.Zhang, and B.Soliven. 2005. Glial cell line-derived neurotrophic factor-induced signaling in Schwann cells. *J. Neurochem.* 94:1488-1499.
- Janes, P.W., S.C.Ley, and A.I.Magee. 1999. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* 147:447-461.

- Ji, R.R., C.M.Böse, C.Lesuisse, D.Qiu, J.C.Huang, Q.Zhang, and F.Rupp. 1998. Specific agrin isoforms induce cAMP response element-binding protein phosphorylation in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18:9695-9702.
- Ji, Y., P.T.Pang, L.Feng, and B.Lu. 2005. Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* 8:164-172.
- Johansson, C.B., S.Momma, D.L.Clarke, M.Risling, U.Lendahl, and J.Frisen. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34.
- Jones, G., A.Herczeg, M.A.Ruegg, M.Lichtsteiner, S.Kröger, and H.R.Brenner. 1996. Substrate-bound agrin induces expression of acetylcholine receptor ϵ -subunit gene in cultured mammalian muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:5985-5990.
- Jones, G., T.Meier, M.Lichtsteiner, V.Witzemann, B.Sakmann, and H.R.Brenner. 1997. Induction by agrin of ectopic and functional postsynaptic-like membrane in innervated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:2654-2659.
- Jones, M.A. and M.J.Werle. 2004. Agrin-induced AChR aggregate formation requires cGMP and aggregate maturation requires activation of cGMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell Neurosci.* 25:195-204.
- Jontes, J.D. and S.J.Smith. 2000. Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron* 27:11-14.
- Julien, M.A., C.A.Haller, P.Wang, J.Wen, and E.L.Chaikof. 2007. Mechanical strain induces a persistent upregulation of syndecan-1 expression in smooth muscle cells. *J. Cell Physiol* 211:167-173.
- Karasewski, L. and A.Ferreira. 2003. MAPK signal transduction pathway mediates agrin effects on neurite elongation in cultured hippocampal neurons. *J. Neurobiol.* 55:14-24.
- Kaverina, I., O.Krylyshkina, and J.V.Small. 2002. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34:746-761.
- Khan, A.A., C.M.Böse, L.S.Yam, M.J.Soloski, and F.Rupp. 2001. Physiological regulation of the immunological synapse by agrin. *Science* 292:1681-1686.
- Kim, C.W., O.A.Golberger, R.L.Gallo, and M.Bernfield. 1994. Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol. Biol. Cell* 5:797-805.
- Kim, M.J., S.L.Cotman, W.Halfter, and G.J.Cole. 2003. The heparan sulfate proteoglycan agrin modulates neurite outgrowth mediated by FGF-2. *J. Neurobiol.* 55:261-277.

- Kim, M.J., I.H.Liu, Y.Song, J.A.Lee, W.Halfter, R.J.Balice-Gordon, E.Linney, and G.J.Cole. 2007b. Agrin is required for posterior development and motor axon outgrowth and branching in embryonic zebrafish. *Glycobiology* 17:231-247.
- Kim, M.J., I.H.Liu, Y.Song, J.A.Lee, W.Halfter, R.J.Balice-Gordon, E.Linney, and G.J.Cole. 2007a. Agrin is required for posterior development and motor axon outgrowth and branching in embryonic zebrafish. *Glycobiology* 17:231-247.
- Kirsch, J., I.Wolters, A.Triller, and H.Betz. 1993. Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 366:745-748.
- Klein, C., E.M.Kramer, A.M.Cardine, B.Schraven, R.Brandt, and J.Trotter. 2002. Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J. Neurosci.* 22:698-707.
- Ko, M., K.Zou, H.Minagawa, W.Yu, J.S.Gong, K.Yanagisawa, and M.Michikawa. 2005. Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 280:42759-42765.
- Kolkova, K., V.Novitskaya, N.Pedersen, V.Berezin, and E.Bock. 2000. Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.* 20:2238-2246.
- Konur, S. and A.Ghosh. 2005. Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron* 46:401-405.
- Korkotian, E. and M.Segal. 1999. Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:12068-12072.
- Koulen, P., L.S.Honig, E.L.Fletcher, and S.Kröger. 1999. Expression, distribution and ultrastructural localization of the synapse-organizing molecule agrin in the mature avian retina. *Eur. J. Neurosci.* 11:4188-4196.
- Koulen, P., M.Sassoé-Pognetto, U.Grünert, and H.Wässle. 1996. Selective clustering of GABA(A) and glycine receptors in the mammalian retina. *J. Neurosci.* 16:2127-2140.
- Kovacic, B., D.Ilic, C.H.Damsky, and D.G.Gardner. 1998. c-Src activation plays a role in endothelin-dependent hypertrophy of the cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.* 273:35185-35193.
- Kramer-Albers, E.M., K.Gehrig-Burger, C.Thiele, J.Trotter, and K.A.Nave. 2006. Perturbed interactions of mutant proteolipid protein/DM20 with cholesterol and lipid rafts in oligodendroglia: implications for dysmyelination in spastic paraplegia. *J. Neurosci.* 26:11743-11752.
- Kröger, S. and S.Mann. 1996. Biochemical and functional characterization of basal lamina-bound agrin in the chick central nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 8:500-509.

- Kröger, S. and J.E.Schröder. 2002. Agrin in the developing CNS: new roles for a synapse organizer. *News Physiol Sci.* 17:207-212.
- Ksiazek, I., C.Burkhardt, S.Lin, R.Seddik, M.Maj, G.Bezakova, M.Jucker, S.Arber, P.Caroni, J.R.Sanes, B.Bettler, and M.A.Ruegg. 2007. Synapse loss in cortex of agrin-deficient mice after genetic rescue of perinatal death. *J. Neurosci.* 27:7183-7195.
- Kumar, V., M.X.Zhang, M.W.Swank, J.Kunz, and G.Y.Wu. 2005. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J. Neurosci.* 25:11288-11299.
- Lacazette, E., C.S.Le, N.Gajendran, and H.R.Brenner. 2003. A novel pathway for MuSK to induce key genes in neuromuscular synapse formation. *J. Cell Biol.* 161:727-736.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Li, W., C.Marshall, L.Mei, L.Dzubow, C.Schmults, M.Dans, and J.Seykora. 2005. Srcasm modulates EGF and Src-kinase signaling in keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 280:6036-6046.
- Li, Z., L.G.W.Hilgenberg, D.K.O'Dowd, and M.A.Smith. 1999. Formation of functional synaptic connections between cultured cortical neurons from agrin-deficient mice. *J. Neurobiol.* 39:547-557.
- Li, Z., J.L.Massengill, D.K.O'Dowd, and M.A.Smith. 1997. Agrin gene expression in mouse somatosensory cortical neurons during development *in vivo* and in cell culture. *Neuroscience* 79:191-201.
- Lin, Y.L., Y.T.Lei, C.J.Hong, and Y.P.Hsueh. 2007. Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway. *J. Cell Biol.* 177:829-841.
- Lucas, K.A., G.M.Pitari, S.Kazerounian, I.Ruiz-Stewart, J.Park, S.Schulz, K.P.Chepenik, and S.A.Waldman. 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* 52:375-414.
- Luo, Z.G., H.S.Je, Q.Wang, F.Yang, G.C.Dobbins, Z.H.Yang, W.C.Xiong, B.Lu, and L.Mei. 2003. Implication of geranylgeranyltransferase I in synapse formation. *Neuron* 40:703-717.
- Ma, L., Y.Z.Huang, G.M.Pitcher, J.G.Valtschanoff, Y.H.Ma, L.Y.Feng, B.Lu, W.C.Xiong, M.W.Salter, R.J.Weinberg, and L.Mei. 2003. Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J. Neurosci.* 23:3164-3175.
- Magill Solc, C. and U.J.McMahan. 1988. Motor neurons contain agrin-like molecules. *J. Cell Biol.* 107:1825-1833.

- Maletic-Savatic, M., R.Malinow, and K.Svoboda. 1999. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283:1923-1927.
- Mantych, K.B. and A.Ferreira. 2001. Agrin differentially regulates the rates of axonal and dendritic elongation in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 21:6802-6809.
- Markham, J.A. and E.Fifkova. 1986. Actin filament organization within dendrites and dendritic spines during development. *Brain Res.* 392:263-269.
- Marshall, C.J. and S.J.Leevers. 1995. Mitogen-activated protein kinase activation by scrape loading of p21ras. *Methods Enzymol.* 255:273-279.
- Marta, C.B., C.M.Taylor, T.Coetzee, T.Kim, S.Winkler, R.Bansal, and S.E.Pfeiffer. 2003. Antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to its rapid repartitioning into detergent-insoluble fractions, and altered protein phosphorylation and cell morphology. *J. Neurosci.* 23:5461-5471.
- Martin, P.T. and J.R.Sanes. 1997. Integrins mediate adhesion to agrin and modulate agrin signaling. *Development* 124:3909-3917.
- Mascarenhas, J.B., M.A.Ruegg, U.Winzen, W.Halfter, J.Engel, and J.Stetefeld. 2003. Mapping of the laminin-binding site of the N-terminal agrin domain (NtA). *EMBO J.* 22:529-536.
- McCroskery, S., A.Chaudhry, L.Lin, and M.P.Daniels. 2006. Transmembrane agrin regulates filopodia in rat hippocampal neurons in culture. *Mol. Cell Neurosci.* 33:15-28.
- McMahan, U.J. 1990. The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55:407-418.
- Megeath, L.J. and J.R.Fallon. 1998. Intracellular calcium regulates agrin-induced acetylcholine receptor clustering. *J. Neurosci.* 18:672-678.
- Meurer, S., S.Pioch, S.Gross, and W.Muller-Esterl. 2005. Reactive oxygen species induce tyrosine phosphorylation of and Src kinase recruitment to NO-sensitive guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 280:33149-33156.
- Meyer, G. and E.L.Feldman. 2002. Signaling mechanisms that regulate actin-based motility processes in the nervous system. *J. Neurochem.* 83:490-503.
- Ming, G., H.Song, B.Berninger, N.Inagaki, M.Tessier-Lavigne, and M.Poo. 1999. Phospholipase C-gamma and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signaling in nerve growth cone guidance. *Neuron* 23:139-148.
- Mirza, M., E.Raschperger, L.Philipson, R.F.Pettersson, and K.Sollerbrant. 2005. The cell surface protein coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) directly associates with the Ligand-of-Numb Protein-X2 (LNX2). *Exp. Cell Res.* 309:110-120.

- Mittaud, P., A.A.Camilleri, R.Willmann, S.Erb-Vogtli, S.J.Burden, and C.Fuhrer. 2004. A single pulse of agrin triggers a pathway that acts to cluster acetylcholine receptors. *Mol. Cell Biol.* 24:7841-7854.
- Moransard, M., L.S.Borges, R.Willmann, P.A.Marangi, H.R.Brenner, M.J.Ferns, and C.Fuhrer. 2003. Agrin regulates rapsyn interaction with surface acetylcholine receptors, and this underlies cytoskeletal anchoring and clustering. *J. Biol. Chem.* 278:7350-7359.
- Morita, A., N.Yamashita, Y.Sasaki, Y.Uchida, O.Nakajima, F.Nakamura, T.Yagi, M.Taniguchi, H.Usui, R.Katoh-Semba, K.Takei, and Y.Goshima. 2006. Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling. *J. Neurosci.* 26:2971-2980.
- Mostafavi-Pour, Z., J.A.Askari, S.J.Parkinson, P.J.Parker, T.T.Ng, and M.J.Humphries. 2003. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J. Cell Biol.* 161:155-167.
- Nagafuku, M., K.Kabayama, D.Oka, A.Kato, S.Tani-ichi, Y.Shimada, Y.Ohno-Iwashita, S.Yamasaki, T.Saito, K.Iwabuchi, T.Hamaoka, J.Inokuchi, and A.Kosugi. 2003. Reduction of glycosphingolipid levels in lipid rafts affects the expression state and function of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins but does not impair signal transduction via the T cell receptor. *J. Biol. Chem.* 278:51920-51927.
- Neuhuber, B. and M.P.Daniels. 2003. Targeting of recombinant agrin to axonal growth cones. *Mol. Cell Neurosci.* 24:1180-1196.
- Neumann, F.R., G.Bittcher, M.Annies, B.Schumacher, S.Kröger, and M.A.Ruegg. 2001. An alternative amino-terminus expressed in the central nervous system converts agrin to a type II transmembrane protein. *Mol. Cell Neurosci.* 17:208-225.
- Neumann-Giesen, C., B.Falkenbach, P.Beicht, S.Claasen, G.Luers, C.A.Stuermer, V.Herzog, and R.Tikkanen. 2004. Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem. J.* 378:509-518.
- Neumann-Giesen, C., I.Fernow, M.Amaddii, and R.Tikkanen. 2007. Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 120:395-406.
- Niell, C.M., M.P.Meyer, and S.J.Smith. 2004. In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. *Nat. Neurosci.* 7:254-260.
- Nikonenko, I., P.Jourdain, and D.Muller. 2003. Presynaptic remodeling contributes to activity-dependent synaptogenesis. *J. Neurosci.* 23:8498-8505.
- Nishiyama, M., A.Hoshino, L.Tsai, J.R.Henley, Y.Goshima, M.Tessier-Lavigne, M.M.Poo, and K.Hong. 2003. Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* 423:990-995.

Okada, K., A.Inoue, M.Okada, Y.Murata, S.Kakuta, T.Jigami, S.Kubo, H.Shiraishi, K.Eguchi, M.Motomura, T.Akiyama, Y.Iwakura, O.Higuchi, and Y.Yamanashi. 2006. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* 312:1802-1805.

Okegawa, T., Y.Li, R.C.Pong, J.M.Bergelson, J.Zhou, and J.T.Hsieh. 2000. The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy. *Cancer Res.* 60:5031-5036.

Pang, L., T.Sawada, S.J.Decker, and A.R.Saltiel. 1995. Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 270:13585-13588.

Pleiman, C.M., M.R.Clark, L.K.Gauen, S.Winitz, K.M.Coggeshall, G.L.Johnson, A.S.Shaw, and J.C.Cambier. 1993. Mapping of sites on the Src family protein tyrosine kinases p55blk, p59fyn, and p56lyn which interact with the effector molecules phospholipase C-gamma 2, microtubule-associated protein kinase, GTPase-activating protein, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell Biol.* 13:5877-5887.

Powell, E.M., J.W.Fawcett, and H.M.Geller. 1997. Proteoglycans provide neurite guidance at an astrocyte boundary. *Mol. Cell Neurosci.* 10:27-42.

Pralle, A., P.Keller, E.L.Florin, K.Simons, and J.K.Horber. 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 148:997-1008.

Puck, T.T. 1958. Quantitative colonial growth of single mammalian cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 71:1141-1142.

Ravel-Chapuis, A., M.Vandromme, J.L.Thomas, and L.Schaeffer. 2007. Postsynaptic chromatin is under neural control at the neuromuscular junction. *EMBO J.* 26:1117-1128.

Ray, J. and F.H.Gage. 1994. Spinal cord neuroblasts proliferate in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 14:3548-3564.

Redmond, L., A.H.Kashani, and A.Ghosh. 2002. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* 34:999-1010.

Renzoni, D.A., D.J.Pugh, G.Siligardi, P.Das, C.J.Morton, C.Rossi, M.D.Waterfield, I.D.Campbell, and J.E.Ladbury. 1996. Structural and thermodynamic characterization of the interaction of the SH3 domain from Fyn with the proline-rich binding site on the p85 subunit of PI3-kinase. *Biochemistry* 35:15646-15653.

Resh, M.D. 1998. Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30:1159-1162.

Richards, D.A., P.De, V, P.Caroni, B.H.Gahwiler, and R.A.McKinney. 2004. AMPA-receptor activation regulates the diffusion of a membrane marker in parallel with dendritic spine motility in the mouse hippocampus. *J. Physiol* 558:503-512.

- Rickles, R.J., M.C.Botfield, X.M.Zhou, P.A.Henry, J.S.Brugge, and M.J.Zoller. 1995. Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:10909-10913.
- Rimer, M., I.Mathiesen, T.Lomo, and U.J.McMahan. 1997. gamma-AChR/epsilon-AChR switch at agrin-induced postsynaptic-like apparatus in skeletal muscle. *Mol. Cell Neurosci.* 9:254-263.
- Roskoski, R., Jr. 2004. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324:1155-1164.
- Rothermel, J.D., B.Jastorff, and L.H.Botelho. 1984. Inhibition of glucagon-induced glycogenolysis in isolated rat hepatocytes by the Rp diastereomer of adenosine cyclic 3',5'-phosphorothioate. *J. Biol. Chem.* 259:8151-8155.
- Ruegg, M.A. and J.L.Bixby. 1998. Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci.* 21:22-27.
- Ruegg, M.A., K.W.Tsim, S.E.Horton, S.Kröger, G.Escher, E.M.Gensch, and U.J.McMahan. 1992. The agrin gene codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution. *Neuron* 8:691-699.
- Rupp, F., D.G.Payan, C.Magill-Solc, D.M.Cowan, and R.H.Scheller. 1991. Structure and expression of a rat agrin. *Neuron* 6:811-823.
- Sadasivam, G., R.Willmann, S.Lin, S.Erb-Vogtli, X.C.Kong, M.A.Ruegg, and C.Fuhrer. 2005. Src-family kinases stabilize the neuromuscular synapse in vivo via protein interactions, phosphorylation, and cytoskeletal linkage of acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* 25:10479-10493.
- Sanchez, S., C.Jimenez, A.C.Carrera, J.az-Nido, J.Avila, and F.Wandosell. 2004. A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. *Neurochem. Int.* 44:231-242.
- Schmid, R.S., W.M.Pruitt, and P.F.Maness. 2000. A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *J. Neurosci.* 20:4177-4188.
- Schon, A. and E.Freire. 1989. Thermodynamics of intersubunit interactions in cholera toxin upon binding to the oligosaccharide portion of its cell surface receptor, ganglioside GM1. *Biochemistry* 28:5019-5024.
- Sedensky, M.M., J.M.Siefker, J.Y.Koh, D.M.Miller, III, and P.G.Morgan. 2004. A stomatin and a degenerin interact in lipid rafts of the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 287:C468-C474.
- Serpinskaya, A.S., G.P.Feng, J.R.Sanes, and A.M.Craig. 1999. Synapse formation by hippocampal neurons from agrin-deficient mice. *Dev. Biol.* 205:65-78.

- Shenoy-Scaria, A.M., D.J.Dietzen, J.Kwong, D.C.Link, and D.M.Lublin. 1994. Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *J. Cell Biol.* 126:353-363.
- Simons, K. and E.Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Simons, K. and D.Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:31-39.
- Smith, M.A., Y.M.Yao, N.E.Reist, C.Magill, B.G.Wallace, and U.J.McMahan. 1987. Identification of agrin in electric organ extracts and localization of agrin-like molecules in muscle and central nervous system. *J. Exp. Biol.* 132:223-230.
- Stetzkowski-Marden, F., K.Gaus, M.Recouvreur, A.Cartaud, and J.Cartaud. 2006. Agrin elicits membrane lipid condensation at sites of acetylcholine receptor clusters in C2C12 myotubes. *J. Lipid Res.* 47:2121-2133.
- Stone, D.M. and K.Nikolics. 1995. Tissue- and age-specific expression patterns of alternatively spliced agrin mRNA transcripts in embryonic rat suggest novel developmental roles. *J. Neurosci.* 15:6767-6778.
- Storms, S.D., A.C.Kim, B.H.T.Tran, G.J.Cole, and B.A.Murray. 1996. NCAM-mediated adhesion of transfected cells to agrin. *Cell Adhesion and Communication* 3:497-509.
- Strochlic, L., A.Cartaud, and J.Cartaud. 2005. The synaptic muscle-specific kinase (MuSK) complex: new partners, new functions. *Bioessays* 27:1129-1135.
- Suter, D.M. and P.Forscher. 2001. Transmission of growth cone traction force through apCAM-cytoskeletal linkages is regulated by Src family tyrosine kinase activity. *J. Cell Biol.* 155:427-438.
- Szczur, K., H.Xu, S.Atkinson, Y.Zheng, and M.D.Filippi. 2006. Rho GTPase CDC42 regulates directionality and random movement via distinct MAPK pathways in neutrophils. *Blood* 108:4205-4213.
- Szebenyi, G., E.W.Dent, J.L.Callaway, C.Seys, H.Lueth, and K.Kalil. 2001. Fibroblast growth factor-2 promotes axon branching of cortical neurons by influencing morphology and behavior of the primary growth cone. *J. Neurosci.* 21:3932-3941.
- Tang, M.X., C.T.Redemann, and F.C.Szoka, Jr. 1996. In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 7:703-714.
- Tansey, M.G., R.H.Baloh, J.Milbrandt, and E.M.Johnson, Jr. 2000. GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* 25:611-623.

- Thaler, C.D. and L.T.Haimo. 1990. Regulation of organelle transport in melanophores by calcineurin. *J. Cell Biol.* 111:1939-1948.
- Thankamony, S.P. and W.Knudson. 2006. Acylation of CD44 and its association with lipid rafts are required for receptor and hyaluronan endocytosis. *J. Biol. Chem.* 281:34601-34609.
- Thomas, S.M. and J.S.Brugge. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:513-609.
- Timpl, R., D.Tisi, J.F.Talts, Z.Andac, T.Sasaki, and E.Hohenester. 2000. Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biology* 19:Special-317.
- Tkachenko, E., E.Lutgens, R.V.Stan, and M.Simons. 2004. Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. *J. Cell Sci.* 117:3189-3199.
- Tkachenko, E. and M.Simons. 2002. Clustering induces redistribution of syndecan-4 core protein into raft membrane domains. *J. Biol. Chem.* 277:19946-19951.
- Tournell, C.E., R.A.Bergstrom, and A.Ferreira. 2006. Progesterone-induced agrin expression in astrocytes modulates glia-neuron interactions leading to synapse formation. *Neuroscience* 141:1327-1338.
- Trinidad, J.C., G.D.Fischbach, and J.B.Cohen. 2000. The agrin/MuSK signaling pathway is spatially segregated from the neuregulin/ErbB receptor signaling pathway at the neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 20:8762-8770.
- Tsen, G., W.Halfter, S.Kröger, and G.J.Cole. 1995. Agrin is a heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 270:3392-3399.
- Tsim, K.W., M.A.Ruegg, G.Escher, S.Kröger, and U.J.McMahan. 1992. cDNA that encodes active agrin. *Neuron* 8:677-689.
- Uhm, C.S., B.Neuhuber, B.Lowe, V.Crocker, and M.P.Daniels. 2001. Synapse-forming axons and recombinant agrin induce microprocess formation on myotubes. *J. Neurosci.* 21:9678-9689.
- Valenzuela, D.M., T.N.Stitt, P.S.Distefano, E.Rojas, K.Mattsson, D.L.Compton, L.Nunez, J.S.Park, J.L.Stark, D.R.Gies, S.Thomas, M.M.Le Beau, A.A.Fernald, N.G.Copeland, N.A.Jenkins, S.J.Burden, D.J.Glass, and G.D.Yancopoulos. 1995. Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* 15:573-584.
- Van Wagenen, S. and V.Rehder. 1999. Regulation of neuronal growth cone filopodia by nitric oxide. *J. Neurobiol.* 39:168-185.

- Van Wagenen, S. and V.Rehder. 2001. Regulation of neuronal growth cone filopodia by nitric oxide depends on soluble guanylyl cyclase. *J. Neurobiol.* 46:206-219.
- Weeks, B.S., V.Papadopoulos, M.Dym, and H.K.Kleinman. 1991. cAMP promotes branching of laminin-induced neuronal processes. *J. Cell Physiol* 147:62-67.
- Weiss, A. and J.Schlessinger. 1998. Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell* 94:277-280.
- Weston, C., C.Gordon, G.Teresa, E.Hod, X.D.Ren, and J.Prives. 2003. Cooperative regulation by Rac and Rho of agrin-induced acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 278:6450-6455.
- Weston, C.A., G.Teresa, B.S.Weeks, and J.Prives. 2007. Agrin and laminin induce acetylcholine receptor clustering by convergent, Rho GTPase-dependent signaling pathways. *J. Cell Sci.* 120:868-875.
- Weston, C.A., B.S.Weeks, and J.M.Prives. 1999. Agrin-induced acetylcholine receptor clustering is mediated by the small GTPases rac and Cdc42. *Mol. Biol. Cell* 10:989.
- Willmann, R., S.Pun, L.Stallmach, G.Sadasivam, A.F.Santos, P.Caroni, and C.Fuhrer. 2006. Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction. *EMBO J.* 25:4050-4060.
- Winzen, U., G.J.Cole, and W.Halfter. 2003. Agrin is a chimeric proteoglycan with the attachment sites for heparan sulfate/chondroitin sulfate located in two multiple serine-glycine clusters. *J. Biol. Chem.* 278:30106-30114.
- Wolven, A., H.Okamura, Y.Rosenblatt, and M.D.Resh. 1997. Palmitoylation of p59fyn is reversible and sufficient for plasma membrane association. *Mol. Biol. Cell* 8:1159-1173.
- Wu, G.Y., K.Deisseroth, and R.W.Tsien. 2001. Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nat. Neurosci.* 4:151-158.
- Xu, X., A.K.Fu, F.C.Ip, C.P.Wu, S.Duan, M.M.Poo, X.B.Yuan, and N.Y.Ip. 2005. Agrin regulates growth cone turning of *Xenopus* spinal motoneurons. *Development* 132:4309-4316.
- Yao, X. 2007. TRPC, cGMP-dependent protein kinases and cytosolic Ca²⁺. *Handb. Exp. Pharmacol.* 527-540.
- Yuste, R. and T.Bonhoeffer. 2004. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:24-34.
- Zhu, D., W.C.Xiong, and L.Mei. 2006. Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J. Neurosci.* 26:4841-4851.

Ziv, N.E. and S.J.Smith. 1996. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.